

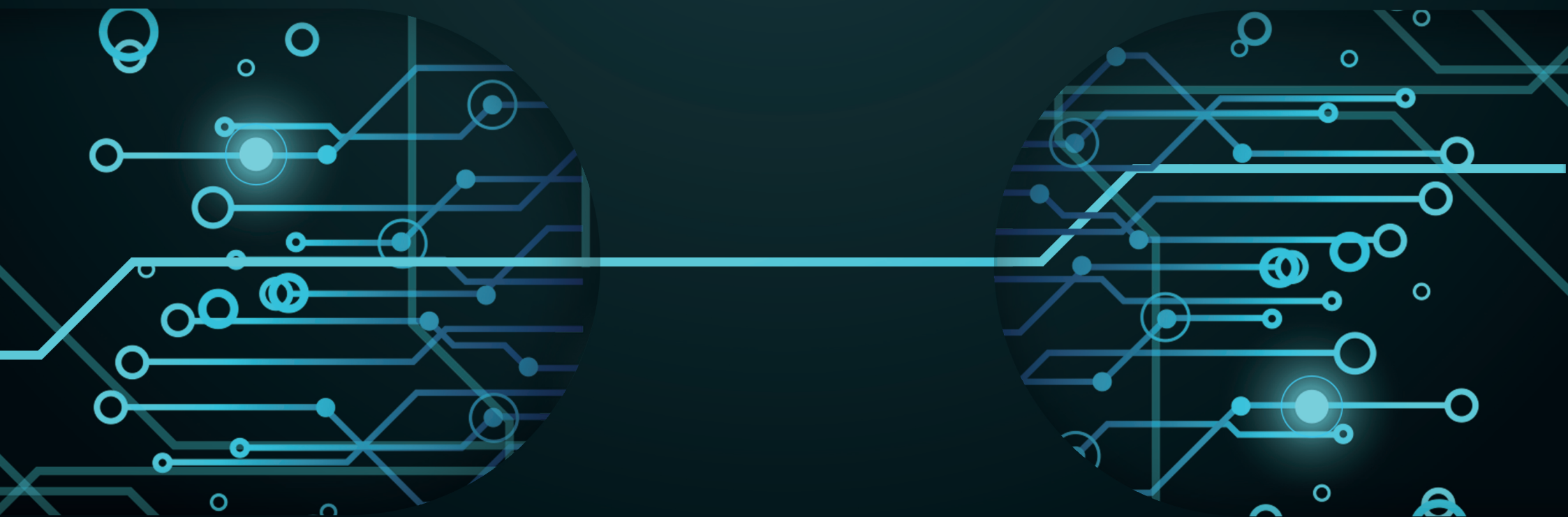


UNIVERSIDAD DE CANTABRIA
*PROGRAMA DE DOCTORADO
EN BIOLOGÍA MOLECULAR Y BIOMEDICINA*

TESIS DOCTORAL

PLÁSMIDOS CONJUGATIVOS PARA LA COMPUTACIÓN BIOLÓGICA

Jorge Rodríguez Grande



DIRIGIDA POR
FERNANDO DE LA CRUZ Y RAÚL FERNÁNDEZ

Santander, 2019

UNIVERSIDAD DE CANTABRIA

PROGRAMA DE DOCTORADO EN BIOLOGÍA
MOLECULAR Y BIOMEDICINA



TESIS DOCTORAL

**Plásmidos conjugativos para la
computación biológica**

PHD THESIS

**Conjugative plasmids for
biological computing**

Realizada por:

Jorge Rodriguez Grande

Dirigida por:

**Fernando de la Cruz Calahorra
y Raúl Fernández López**

Escuela de Doctorado de la Universidad de Cantabria

Santander 2019

D. **Fernando de la Cruz Calahorra**, Catedrático de Genética, y D. **Raúl Fernández López**, Contratado Doctor, ambos pertenecientes al Departamento de Biología Molecular de la Universidad de Cantabria,

CERTIFICAN: Que D. **Jorge Rodríguez Grande** ha realizado bajo nuestra dirección el presente trabajo de Tesis Doctoral titulado: **Plásmidos conjugativos para la computación biológica**.

Consideramos que dicho trabajo se encuentra terminado y reúne los requisitos de originalidad y calidad científica para su presentación como Memoria de Doctorado al objeto de poder optar al grado de Doctor con opción a mención internacional por la Universidad de Cantabria. Asimismo, el doctorando ha participado en una publicación y se encuentra actualmente preparando dos artículos científicos que serán publicados próximamente.

Y para que conste y surta los efectos oportunos, expedimos el presente certificado en Santander, a 16 de Septiembre de 2019.

Fdo. Fernando de la Cruz Calahorra

Fdo. Raúl Fernández López

Indice

1. INTRODUCCION	5
1.1 Introducción a la biología de plásmidos.....	5
1.2 Replicación	6
1.3 Grupos de incompatibilidad (Inc).....	8
1.4 Abundancia natural e importancia de los plásmidos	9
1.5 La Transmisión Genética Horizontal.....	10
1.6 La conjugación.....	11
1.6.1 Mecanismo y componentes de la conjugación	12
1.6.2. Organización transcripcional de la region TRA	15
1.6.3. Estructura del sistema de secreción.....	16
1.6.4. Movilización y conjugación	18
1.7. Métodos experimentales de medida de la conjugación	20
1.7.1 Métodos cuantitativos de medida de la conjugación	21
1.8. Modelos epidemiológicos de propagación de infecciones	23
1.9. Modelos de transmisión en plásmidos	24
1.10. Coevolución plásmido-hospedador	27
1.11. Computación biológica.....	29
1.12. PLASWIRES	31
1.12.1. Concepto	31
1.12.2. Propiedades del sistema	32
1.12.3. Componentes del sistema.....	33
2. Materiales y métodos	37
2.1. Materiales	37
2.1.1 Cepas de Escherichia coli.....	37
2.1.2. Cultivos bacterianos	37
2.1.3. Antibióticos e inductores de la expresión genética	38
2.1.4. Plásmidos	38
2.1.5. Vectores de clonación	39
2.1.6. Plásmidos construidos en esta tesis.....	40
2.1.7. Oligonucleótidos	41
2.2 Métodos	45
2.2.1. Extracción de ADN.....	45
2.2.2. PCR (reacción en cadena de la polimerasa)	45
2.2.3. Electroforesis en gel de agarosa	45

2.2.4. Extracción de ADN desde gel de agarosa	46
2.2.5. Digestión enzimática de ADN	46
2.2.6. Purificación de ADN.....	46
2.2.7. Cuantificación de ADN.....	46
2.2.8. Método de ensamblaje isoterma o Gibson assembly.....	47
2.2.9. Microdiálisis	47
2.2.10. Producción de células electrocompetentes.	47
2.2.11. Integración de ADN de interés en el cromosoma de <i>E.coli</i>	48
2.2.12. Mutagénesis dirigida	49
2.2.13. Comprobación mediante secuenciación	49
2.3 Métodos de conjugación.....	50
2.3.1. Conjugaciones en placa de 24 pocillos.....	50
2.3.2. Conjugaciones en líquido	51
2.3.4. Conjugaciones con el sistema intimina-tir	51
2.3.4. Conjugaciones en turbidostato	51
2.3.5. Citometría de flujo	52
2.3.6. Microscopía de fluorescencia.....	52
2.3.7. Medidas de crecimiento.....	52
2.3.8. Eficiencia de conjugación y movilización	52
3. Objectives.....	55
4. Resultados	57
R1. Puesta a punto del protocolo de conjugación sobre placas de LB agar.....	57
1.1. Error propagado en la medida de eficiencia de conjugación en el protocolo de conjugación en sólido y plaqueo con bolas de vidrio.	57
1.2. Optimización del protocolo de conjugación.	62
1.2.2. Variación en la medida de eficiencia al refrescar los inóculos.....	62
1.3 Protocolo de conjugación optimizado.....	67
R2. La conjugación es un proceso dependiente de frecuencia.	68
2.1. Variación en la eficiencia de conjugación alterando las proporciones de donadores y receptores.	68
2.2. Variación en la eficiencia de conjugación con la concentración de la mezcla de conjugación.	69
R3. Factores limitantes en la conjugación de R388.....	73
3.1. Caracterización de la conjugación de R388 y la movilización por la cepa del cable a distintos tiempos.....	73
3.2. Determinación de la conjugación primaria del plásmido R388 distintos tiempos.	74

3.3. Cinéticas de movilización empleando receptores competentes para la movilización.	76
3.4. Efecto de la sobreexpresión de genes y operones esenciales en la conjugación.	77
3.5. Efecto de un aumento en la capacidad de adhesión entre donadores y receptores sobre la eficiencia de conjugación (en líquido y en sólido).....	80
3.6. Efecto del número de copias del plásmido en la eficiencia de conjugación.	86
3.7. Efecto de la sobreexpresión del gen <i>stbB</i> sobre la eficiencia de conjugación de R388.	87
R4. Fabricación de una cepa movilizadora sin pérdida de señal.....	89
4.1. Medidas de eficiencia de conjugación de otros plásmidos altamente conjugativos...	89
4.2. Interacciones entre los sistemas conjugativos de R388 y pKM101.	90
4.3. Medidas de eficiencia de movilización del sistema de pKM101.....	93
5. Discussion.....	96
5.1. The challenge of computing with plasmids.....	96
5.2. Frequency-Dependent Transmission.	98
5.3. Limiting factors on conjugation efficiency	100
5.4. Obtaining a super-conjugator and implications for building a conjugation-based logic device.	103
6. Conclusions	106
7. Resumen en castellano	107
7.1. Computar con plásmidos.....	108
7.2. Transmisión dependiente de frecuencia.....	108
7.3. Factores limitantes en la conjugación de R388.....	109
7.4. Construcción de una cepa movilizadora eficiente.	109
6. Bibliography	112

Introducción

1. INTRODUCCION

1.1 Introducción a la biología de plásmidos

Los plásmidos son moléculas de ADN circulares (aunque existen algunos plásmidos lineales, Hinnebusch and Tilly, 1993) de hebra doble que habitan en el interior de células procariotas, arqueas y algunos eucariotas y se replican de forma autónoma respecto del ADN cromosómico de sus hospedadores.

A diferencia de otros parásitos como los virus, todo su ciclo vital sucede dentro de la célula hospedadora, por lo que generalmente han evolucionado para habitar en una suerte de mutualismo (Harrison, Guymer, *et al.*, 2015). Aunque dispensables, los plásmidos suelen portar genes beneficiosos para sus hospedadores, como los genes de resistencia a antibióticos, a metales pesados, genes de metabolismo secundario, catabolismo de xenobióticos, o genes de patogenicidad (de la Cruz and Davies, 2000).

Algunos plásmidos, además, se transmiten no solo por herencia vertical (como los cromosomas) sino también por transferencia horizontal entre células próximas (no necesariamente de la misma especie), en un proceso activo conocido como conjugación. Como gran parte del presente trabajo gravita en torno a la conjugación de plásmidos, este fenómeno se describe con más detalle más adelante.

El tamaño de un plásmido varía desde cerca de mil pares de bases (Staal *et al.*, 2019) hasta más de dos millones de pares de bases (Kado, 1998), (Medema *et al.*, 2010). Como su replicación es autónoma, cada plásmido produce un número de copias determinado, que puede variar entre hospedadores y que puede ir desde solo una hasta más de mil copias por célula (Boros, Pósfai and Venetianer, 1984; Nordström and Uhlin, 1992), dependiendo del sistema de replicación codificado por el propio plásmido y de los genes *cop/inc* de control del número de copias.

Por lo general, el contenido genético de los plásmidos está distribuido en módulos separados por función, que por lo general han evolucionado por separado y a menudo han sido adquiridos en bloque durante eventos puntuales de transferencia genética horizontal desde otros plásmidos (Fidélma Boyd *et al.*, 1996), el cromosoma del hospedador y fagos mediante otros elementos genéticos móviles como integrones, transposones y secuencias de inserción presentes en un momento determinado en la célula. Esto favorece a su vez que los plásmidos actúen como vectores que aportan genes y operones completos novedosos a los hospedadores en los que habitan (Bosi, Fani and Fondi, 2011). Además, confiere carácter de mosaico genético al plásmido (Fernández-López *et al.*, 2006; Bosi, Fani and Fondi, 2011) y los elementos adquiridos horizontalmente dejan una huella trazable de los hospedadores por los que ha pasado en su historia evolutiva (Suzuki *et al.*, 2010).

1.2 Replicación

Todos los plásmidos poseen una secuencia de inicio de la replicación, conocida como *oriV* (“origen de replicación Vegetativa”, en oposición al “origen de replicación por Transferencia” descrito más adelante) que es reconocido por una proteína (Rep) iniciadora de la replicación codificada en el plásmido o en el cromosoma hospedador (del Solar *et al.*, 1998).

Una vez unida la proteína al *oriV* los plásmidos pueden replicar de dos formas distintas: 1) la proteína iniciadora fuerza la apertura de la doble hélice, recluta otras proteínas, y se inserta un cebador que servirá para la replicación (modo Theta, θ , por el aspecto que cobran los plásmidos bajo el microscopio electrónico durante el proceso de replicación, es el más común en bacterias Gram (-) (Lilly and Camps, 2015) o bien 2) la proteína hace una mella en el ADN desde la que se comienza a replicar en círculo rodante una o más copias del nuevo plásmido (modo RCR por “Rolling circle replication”, más habitual en bacteriófagos y plásmidos de bacterias Gram (+) (Ruiz-Masó *et al.*, 2015).

Para controlar el número de veces que se replica un plásmido se emplea el sistema de control de número de copias, que puede consistir en:

- Empleo de la propia proteína Rep: 1) que actúa bloqueando su propia expresión en un bucle de retroalimentación negativa (NFL en sus siglas en inglés) o 2) que se une al *oriV* de dos plásmidos idénticos, bloqueando la replicación y manteniendo ambos unidos.
- Empleo de RNAs pequeños expresados constitutivamente que aumentan de concentración con el nº de copias del plásmido y bloquean la expresión de la Rep o de los cebadores de inicio de la replicación.

En ocasiones, después de replicarse o tras sufrir recombinación homóloga, los plásmidos pasan a formar dímeros o multímeros encadenados que ponen en riesgo una segregación correcta del plásmido durante la replicación celular. Por ello, a menudo expresan unas proteínas que ayudan a resolver estos tándem: las **resolvasas**, que pueden pertenecer a la familia de las serín-recombinasas (también implicadas en la biología de transposones (Rice, 2015) o de las tirosín-recombinasas (ubicuas en la naturaleza, implicadas en mecanismos que van desde la replicación de cromosomas de arqueas hasta la integración de fagos (Meinke *et al.*, 2016).

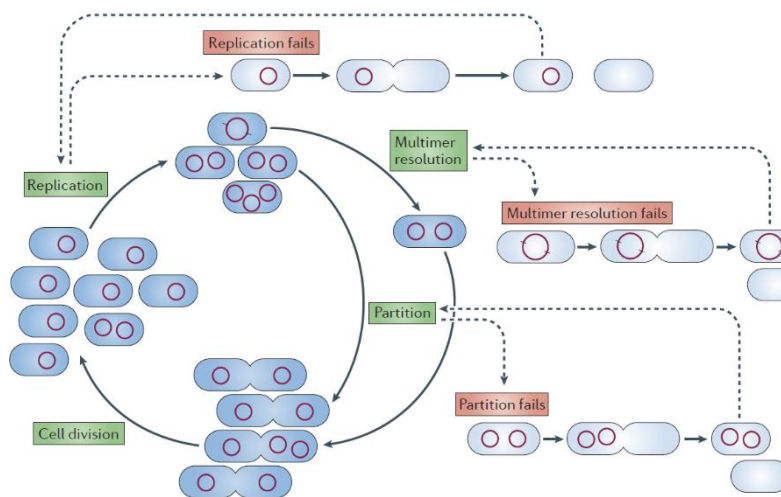


Figura 1. Distintos mecanismos que llevan a la pérdida del plásmido durante la división celular. En azul, células portando plásmidos (en rojo). El ciclo (abajo a la izquierda) indica el mecanismo habitual de partición durante la división. Si la replicación del plásmido falla (arriba), sólo una de las células hijas podrá portar el plásmido tras la división. Algo parecido pasará si todas las copias pasan a formar un multímero y la resolvasa (dcha.) no actúa adecuadamente, o si el sistema de partición no actúa como debiera (abajo dcha.) (tomado de Pinto 2012).

Segregación y estabilidad: Para asegurar su pervivencia durante la replicación de sus hospedadores, los plásmidos han desarrollado dos mecanismos alternativos de supervivencia, relacionados estrechamente con su número de copias. Para mantenerse en un hospedador después de la división celular, los plásmidos de alto número de copias (más de 10 por célula

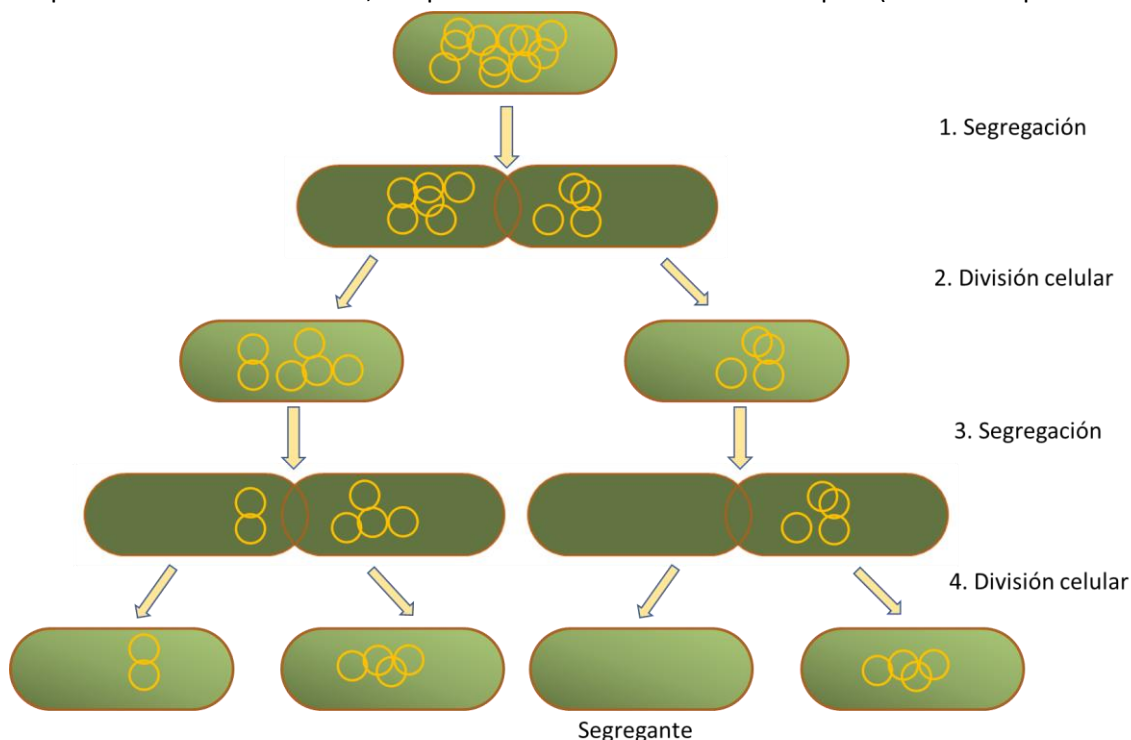


Figura 1 2. Pérdida del plásmido por segregación aleatoria. Se representa el progreso de una célula (en verde, arriba) que porta un plásmido de alto número de copias (en amarillo) durante dos pasos de segregación aleatoria y división celular. Finalmente se producen cuatro células con cantidades variables de plásmidos. Las que no portan ninguno se llaman "segregantes". Este esquema, por supuesto, es muy simplista: se supone que la segregación es más efectiva y ni siquiera se está teniendo en cuenta la replicación de los plásmidos.

(Summers and Sherratt, 1984)) se distribuyen libremente (Summers, 1998), formando aglomeraciones o "clusters", (Pogliano *et al.*, 2001; Ho *et al.*, 2002; Pogliano, 2002) o una mezcla de ambos modos (Reyes-Lamothe *et al.*, 2014; Wang, Penkul and Milstein, 2016; Wang, 2017), por toda la célula y se reparten de forma aleatoria entre las dos células nuevas (Durkacz and Sherratt, 1973; Nordstrom, 1989) lo que garantiza probabilidades muy bajas ($P_0 = 2^{1-2n}$, siendo n el nº de copias del plásmido (Summers, 1991) de que una de ellas quede desprovista.

Los plásmidos con bajo número de copias (1-5 copias por cromosoma generalmente) expresan sistemas activos de partición (mediante ATPasas tipo Walker o tipo actina o mediante GTPasas tipo tubulina) que reparten las copias del plásmido desde un centrómero hasta ambos polos celulares (Baxter and Funnell, 2014). Estos plásmidos suelen contar también con sistemas de adicción de tipo toxina/antitoxina (Jaffe, Ogura and Hiraga, 1985; Hayes, 2003) que eliminan las células que hayan perdido el plásmido durante la replicación (pérdida por segregación), razón por la que se les llama sistemas de muerte post-segregación (post-segregational killing, psk) y sistemas de adicción molecular.

1.3 Grupos de incompatibilidad (Inc)

Dos plásmidos que comparten la maquinaria de replicación y de partición no pueden cohabitar el mismo hospedador durante muchas generaciones: ya sean las fluctuaciones en el número de copias heredadas, el secuestro de la maquinaria por uno o por otro, o el descenso relativo en el fitness que generen las proporciones de uno u otro en la descendencia, después de un número suficientemente grande de generaciones, la población queda ocupada por uno solo de los dos plásmidos iniciales.

Este fenómeno fue utilizado (Meynell, Meynell and Datta, 1968; Datta and Hedges, 1971; Novick, 1987) para clasificar a los plásmidos en grupos identificables de propiedades comunes (ya que se consideraba que maquinarias de replicación similares implicaban necesariamente cercanía filogenética). Se describieron alrededor de 20 grupos de incompatibilidad en enterobacterias, de los cuales los más relevantes para este trabajo son los grupos IncP, IncN e IncW (que comparten propiedades similares en sus sistemas de conjugación, regulación y rango de hospedador).

Aunque actualmente existen otros métodos mucho más útiles y rápidos para determinar la proximidad filogenética de los nuevos plásmidos que se van secuenciando, como el tipado por PCR del replicón (Götz *et al.*, 1996; Carattoli *et al.*, 2014) o de la relaxasa en plásmidos movilizables (Garcillán-Barcia, Francia and De La Cruz, 2009; Garcillán-Barcia and de la Cruz, 2013; Orlek *et al.*, 2017), aún hay problemas para atribuir algunas propiedades a los plásmidos ya descritos y secuenciados (Brooks, Kaze and Siström, 2019) en parte porque gracias a las modernas técnicas de secuenciación el número de ellos crece tan rápidamente que muchos no llegan a ser correctamente anotados. Por este motivo y por comodidad, la clasificación por grupos de incompatibilidad sigue empleándose, especialmente con plásmidos modelo clásicos como los empleados en este trabajo.

El **rango de hospedadores** (Host Range) en los que puede replicarse de forma estable un plásmido es una medida cualitativa que se emplea para distinguir aquellos plásmidos adaptados a unas pocas especies bacterianas (en enterobacterias los mejor conocidos son IncF, IncH e IncI) de aquellos que pueden replicar autónoma y establemente en gran cantidad de especies (IncP, IncQ, IncN e IncW, en enterobacterias) (Smillie *et al.*, 2010; Suzuki *et al.*, 2010; Jain and Srivastava, 2013; Shintani, Sanchez and Kimbara, 2015).

Sin embargo, hay que hacer varios comentarios a este método, ya clásico, de identificar familias de plásmidos: primero, que el rango de hospedadores en los que un plásmido puede replicar siempre será más amplio que el rango de hospedadores que pueden mantener establemente al plásmido y más estrecho que el rango de hospedadores en los que un plásmido puede moverse, como veremos, por conjugación. Segundo, que este rango de hospedadores varía continuamente, y un plásmido puede reducir en escalas de tiempo relativamente cortas su rango (Dionisio *et al.*, 2005; Bottery, Wood and Brockhurst, 2017), o ampliarlo mientras evoluciona en una población (De Gelder *et al.*, 2008; Loftie-Eaton *et al.*, 2016). Tercero, que la estabilidad de un plásmido varía entre cepas de una misma especie, estando su existencia a la presencia en éstas de sistemas de restricción-modificación o de sistemas CRISPR-Cas. Por último, que la separación clásica entre rango amplio o estrecho ha demostrado quedarse obsoleta hace tiempo, y que hay plásmidos que estarían en un rango intermedio o de los que no se conoce adaptación a ninguna especie conocida (Suzuki *et al.*, 2010).

1.4 Abundancia natural e importancia de los plásmidos

Los plásmidos están ampliamente distribuidos en el reino procariota y son el principal vehículo de su diversidad y plasticidad genética (Smillie *et al.*, 2010; Wiedenbeck and Cohan, 2011). Gracias al cargamento genético que transportan entre hospedadores favorecen la adaptabilidad de los microorganismos a todo tipo de entornos y amenazas ambientales (Ochman, Howard, Lawrence, Jeffrey G. and Groisman, Eduardo A., 2000). La mayor prueba de ello la hemos experimentado los humanos en los últimos 90 años: desde la aparición del primer tratamiento antibiótico las bacterias han desarrollado todo un arsenal de resistencias a antibióticos que hacen muy problemático el tratamiento y erradicación de ciertas infecciones y enfermedades de origen bacteriano (Carattoli, 2013). La expansión de estas resistencias ha sido potenciada por el uso extensivo de antibióticos para uso humano y, sobre todo, en ganadería (Marshall and Levy, 2011).

Gracias a los modernos métodos de secuenciación masiva tenemos disponibles las secuencias de unos 13.000 plásmidos procedentes de entornos naturales y cepas clínicas, 2500 de ellos pertenecientes a enterobacterias (Brooks, Kaze and Siström, 2019), aunque hay un enorme sesgo de muestreo debido a que la mayoría se hacen sobre patógenos multirresistentes y se sospecha que la variedad y cantidad total es muchísimo mayor. De todos estos entre un 50% (Smillie *et al.*, 2010) y un 85% (Orlek *et al.*, 2017) tienen una relaxasa identificable (Garcillán-Barcia, Francia and De La Cruz, 2009) y se les supone movilizables (ver más adelante Sección 1.6.4 movilización y conjugación).

Los plásmidos han sido, desde la década de los 70, el material fundamental sobre el que se ha construido la biotecnología. Disponer de una molécula de ADN modificable a voluntad, de replicación modulable, y seleccionable de forma barata mediante antibióticos u otros métodos tras introducirla en el organismo deseado (potencialmente cualquier organismo vivo) ha hecho posible la generación de organismos modificados genéticamente.

Por lo general, cuando un plásmido es empleado para expresar un producto génico es llamado “vector de expresión”. Los vectores más utilizados en biotecnología han sido refinados artificialmente a lo largo de décadas, eliminando secuencias prescindibles y añadiendo otras, de tal forma que ya se pueden adquirir comercialmente plásmidos sintéticos con un número de copias determinado, marcador de selección, origen de transferencia, marcador para la inserción en el cromosoma del hospedador, promotores para la síntesis regulable del inserto que se desee y un largo etcétera. De la misma forma, las técnicas de recombinación y ensamblaje modernas, junto con las técnicas de síntesis de oligonucleótidos a la carta, permiten la inserción en estos vectores de -potencialmente- cualquier secuencia de ADN. Los organismos a los que se introduce el producto final, en los que se replica autónomamente o se inserta en el cromosoma, son llamados “clones”.

Estos clones se emplean para todo tipo de fines: desde producción heteróloga de proteínas recombinantes o productos químicos, a establecimiento de líneas celulares o incluso organismos enteros modificados genéticamente, ya sean animales, plantas o microorganismos. Por otro lado, las aplicaciones biomédicas y para investigación básica son incontables.

1.5 La Transmisión Genética Horizontal

A nivel evolutivo se considera que los plásmidos han jugado un papel fundamental en la evolución de los microorganismos, dado que son el principal vector de transmisión génica horizontal (HGT en inglés), mecanismo que ha dado forma a la mayor parte del genoma bacteriano.

Se estima que el 20% de genes recientes y el 80% de genes totales en proteobacterias han sido adquiridos por HGT (Dagan, Artzy-Randrup and Martin, 2008; Koesges *et al.*, 2011), aunque otros estudios elevan esta cifra a un 90% (Mirkin *et al.*, 2003), y el proceso es más rápido que la adquisición de nuevas funciones por deriva genética: por ejemplo, 755 genes de *Escherichia* han sido adquiridos desde su separación de *Salmonella*, hace 100 millones de años (Lawrence, Ochman and Selander, 1998), la mayoría en los últimos 10 millones de años. Esto plantea serios problemas a la hora de trazar árboles filogenéticos similares a los de eucariotas (Koesges *et al.*, 2011; Pota and Dagan, 2011).

La transferencia genética horizontal puede darse a nivel intracelular, mediante la acción de transposones e integrones, o a nivel intercelular por tres mecanismos: transformación, transducción y conjugación.

La **transformación** consiste en la adquisición de ADN libre del entorno, con la posterior integración en un replicón estable y expresión funcional. Suele provenir de células muertas del entorno. Para que se produzca la adquisición y posterior recombinación la célula tiene que encontrarse en un estado fisiológico conocido como “competencia” que se puede inducir en laboratorio y que en la naturaleza es una respuesta a factores de estrés ambiental (falta de nutrientes, diferencias bruscas de temperatura o salinidad, etc.).

La **transducción** usa como vectores a los fagos líticos. Estos empaquetan en su cápside el material genético que ha estado insertado en el cromosoma de su hospedador durante la fase lisogénica y, por imprecisiones del sistema, arrastran en ocasiones algunas secuencias flanqueadoras. Cuando lisan al antiguo hospedador llevan empaquetada consigo esta secuencia, que entra en el nuevo hospedador durante la infección, y allí se integra (junto con el ADN del fago) por recombinación en el cromosoma, pasando a formar parte de su genoma.

La **conjugación** emplea como vectores a los plásmidos. Consiste en la transferencia de una de las hebras del plásmido, unida a una relaxasa, desde un donador a un receptor próximo, a través de un sistema de secreción de tipo IV. Esta definición se extenderá algo más adelante.

La conjugación sucede de forma preferente entre organismos similares: misma cepa dentro de una misma especie (Gordon, 1992; Dimitriu *et al.*, 2019) y misma especie en un entorno heterogéneo (Schafer, Kalinowski and Puhler, 1994; Dionisio *et al.*, 2002) sin embargo, la conjugación se ha dado entre especies e incluso entre reinos (Doolittle and Logsdon, 1998; Grillot-Courvalin *et al.*, 1998; Jain, Rivera and Lake, 1999; Nelson *et al.*, 1999; Wolf *et al.*, 1999; de la Cruz and Davies, 2000; Smillie *et al.*, 2010).

Por otro lado, dado que algunas de las características fenotípicas adquiridas por las bacterias mediante transferencia horizontal ponen en grave riesgo la salud humana (genes de resistencia a antibióticos e islas de patogenicidad) y que éstas han sido en su mayoría transmitidos por conjugación de plásmidos (hasta el punto de que gran parte de las bacterias patógenas que se recogen de aislados clínicos actualmente son resistentes a una enorme variedad de

antibióticos), se considera prioritario estudiar en profundidad este mecanismo y la epidemiología de su expansión en distintas poblaciones, tanto en laboratorio como en entornos naturales.

1.6 La conjugación

La conjugación consiste en la transmisión de una de las hebras de una molécula de ADN desde una célula (donadora) a otra célula cercana (receptora) mediante la acción concertada de un relaxosoma y el empleo de un sistema de secreción de tipo IV (T4SS, ambos en la célula donadora) que pone en contacto ambas células y sirve de conducto por la hebra de ADN. Para que se de esta transmisión la molécula de ADN solo necesita tener una secuencia conocida como “origen de transferencia” u *oriT*. El proceso, tras el envío y la síntesis de la hebra complementaria en donador y receptor genera dos copias de la molécula. La célula que recibe el plásmido pasa a llamarse “transconjugante”.

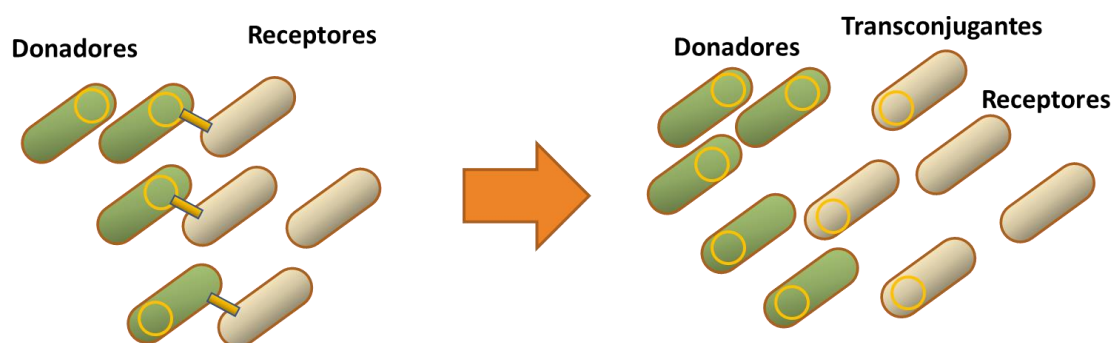


Figura 1 3. Esquema de la conjugación de plásmidos. A la izquierda, una mezcla de bacterias donadoras (en verde) portando un plásmido conjugativo (en amarillo) que puede expresar un sistema de secreción (naranja) para enviar una copia del plásmido a las bacterias receptoras (en gris). A la derecha, el producto de la conjugación: las donadoras siguen igual, pero algunas de las receptoras han adquirido un plásmido por conjugación y pasan a llamarse transconjugantes.

Descubierto originalmente en *E.coli* (Lederberg and Tatum, 1946; Tatum and Lederberg, 1947), este fenómeno puede darse en todos los reinos de la vida enriqueciendo en gran medida sus genomas (de la Cruz and Davies, 2000) y garantizando, como contrapartida, la pervivencia de los plásmidos (Stewart and Levin, 1977; Bergstrom, Lipsitch and Levin, 2000), aunque esto es controvertido, dado que hay muchos plásmidos no conjugativos, o que en apariencia conjugan mucho menos de lo esperable como para sobrevivir.

La conjugación puede ser llevada a cabo por plásmidos o por transposones conjugativos (o ICEs: Integrative and Conjugative Elements, (Johnson and Grossman, 2015)) en casi cualquier ambiente en el que vivan bacterias (Dröge, Pühler and Selbitschka, 1999; Dionisio *et al.*, 2002; Sørensen *et al.*, 2005; Pinilla-Redondo *et al.*, 2018).

La transferencia conjugativa de plásmidos ocurre en numerosos entornos. Sin embargo, existen algunos puntos en los que la presencia de microorganismos especialmente capacitados para la transmisión conjugativa de ciertos plásmidos (Dionisio *et al.*, 2002), sumada a factores ambientales como el pH, la humedad y la temperatura del suelo (Richaume, Angle and Sadowsky, 1989) o la formación de biofilms (Hausner and Wuertz, 1999) favorece extraordinariamente la eficiencia del proceso. La presencia de vectores biológicos como animales (Daane, Molina and Sadowsky, 1997), hongos (Sengeløv, Kovvalchuk and Sørensen,

2000) o plantas (Sørensen and Jensen, 1998) también favorece los encuentros entre donadores y receptores, incrementando la eficiencia del proceso.

A nivel clínico la conjugación está cobrando una relevancia sin precedentes debido a la expansión de plásmidos que portan genes de resistencia a todo tipo de antibióticos, especialmente los de última generación, dando lugar a cepas multi-resistentes (MDR) o extra-resistentes. Este ámbito es muy extenso y queda fuera de los límites de este trabajo, así que me remito a varias revisiones sobre el tema: (Williams and Hergenrother, 2008; Lopatkin *et al.*, 2017; Buckner, Ciusa and Piddock, 2018; Klemm, Wong and Dougan, 2018; San Millan, 2018; Li *et al.*, 2019)

En este trabajo nos vamos a centrar exclusivamente en la transmisión conjugativa de plásmidos en enterobacterias, y más concretamente en la conjugación de plásmidos modelo de los grupos IncW e IncN (R388 y pKM101, respectivamente) en cepas de laboratorio de *Escherichia coli*, una Gamma proteobacteria.

1.6.1 Mecanismo y componentes de la conjugación

El modelo para el mecanismo de conjugación en bacterias gram negativas (Llosa *et al.*, 2002; Cabezón *et al.*, 2015) implica la acción concertada de dos maquinarias multiproteicas: el relaxosoma, codificado en la región *dtr* (por DNA Transfer and Replication, en inglés), y el sistema de secreción, codificado en la región *mpf* (por Mating Pilus Formation), puestos en contacto por la proteína acopladora (generalmente codificada también en la región *dtr*). La región en la que se codifican ambas regiones es conocida como región *tra*.

El **relaxosoma**, está compuesto por un relaxasa y una o varias proteínas accesorias (Rap, por Relaxase-Accessory Proteins en inglés). Tanto la relaxasa como las RAPs reconocen la secuencia oriT en el plásmido (Guasch *et al.*, 2003; Moncalián and De La Cruz, 2004). Las RAP exponen el sitio “nic”, en el que la relaxasa corta el enlace fosfodiéster, quedándose unida covalentemente al extremo 5' y dejando libre un extremo 3' que servirá como cebador para una replicación en círculo rodante (Llosa, Grandoso and Cruz, 1995; Llosa *et al.*, 2002; Guasch *et al.*, 2003; Draper *et al.*, 2005). Debido a este corte el plásmido “relaja” su superenrollamiento, catalizado por la función helicasa de la enzima, motivo por el que recibe su nombre la relaxasa (Draper *et al.*, 2005; Garcillán-Barcia, Francia and De La Cruz, 2009). En el plásmido modelo R388 principalmente usado en esta tesis, el relaxosoma está formado por dos proteínas del plásmido (TrwA y TrwC) así como la proteína del hospedador IHF (por Integration Host Factor) que estabiliza el complejo e inhibe a la relaxasa (Moncalián *et al.*, 1999).

TrwA, la proteína Rap de R388, es una proteína de 121 aminoácidos que pertenece a la familia RHH (Llosa, Zunzunegui and de la Cruz, 2003; Moncalián and De La Cruz, 2004). Se une a secuencias en el oriT formando tetrámeros y cumple varias funciones en la conjugación de R388. Su dominio N-terminal está implicado en la unión a ADN mientras que la región C-terminal está implicada en la oligomerización. Sus dos funciones principales son las de represor transcripcional del operón *mob* (Moncalián *et al.*, 1997) y de colaborador para la relajación del ADN y el establecimiento de la estructura del relaxosoma, potenciando la acción de la relaxasa TrwC (César *et al.*, 2006). El tetrámero sirve, además, como sitio de reconocimiento de la proteína acopladora, TrwB. TrwA no es imprescindible para la conjugación, pero la delección de este gen provoca un descenso de la eficiencia de conjugación del 99% (Moncalián *et al.*, 1997).

TrwC es la relaxasa, una proteína de casi 1000 aminoácidos compuesta por dos dominios: el N-terminal con actividad relaxasa (para cortar una de las hebras del ADN en la posición *nic*) y el C-terminal con actividad helicasa (para desplegar el ADN en dirección 5'→3'). Además presenta una región de interacción que le lleva a formar homodímeros en solución (Grandoso *et al.*, 1994). Es la responsable del inicio de la conjugación, es reconocida por *TrwB* (Fernández-González *et al.*, 2011) para ser lanzada por el sistema de secreción hasta la célula receptora con la hebra del plásmido unida y, una vez allí, finaliza el proceso de la conjugación recircularizando dicha hebra (Draper *et al.*, 2005; Garcillán-Barcia *et al.*, 2007).

El **sistema de secreción**, contactado con el relaxosoma por la proteína acopladora (T4CP) bombea la relaxasa, unida al ADN, a través de las membranas del donador y del receptor (ver Figura 14). De los nueve tipos de sistemas de secreción descritos en bacterias, el implicado en la conjugación es el tipo IV (T4SS, (Grohmann *et al.*, 2018)). El sistema de secreción tipo IV está compuesto de ocho proteínas que forman un complejo cilíndrico hueco que atraviesa las dos membranas (en las bacterias gran negativas) conocido como complejo del poro, central o *core complex* (Cascales and Christie, 2003; Llosa and O'Callaghan, 2004; Christie *et al.*, 2005; Fronzes *et al.*, 2009; Llosa, Roy and Dehio, 2009; Low *et al.*, 2014). Dos de estos componentes son además ATPasas que actúan como motores para la exportación de los componentes del sistema de secreción y para el bombeo del complejo relaxasa-ADN (Llosa *et al.*, 2002; Cabezón *et al.*, 2015).

El **pilus** es una estructura alargada, en algunos casos retráctil (Clarke *et al.*,

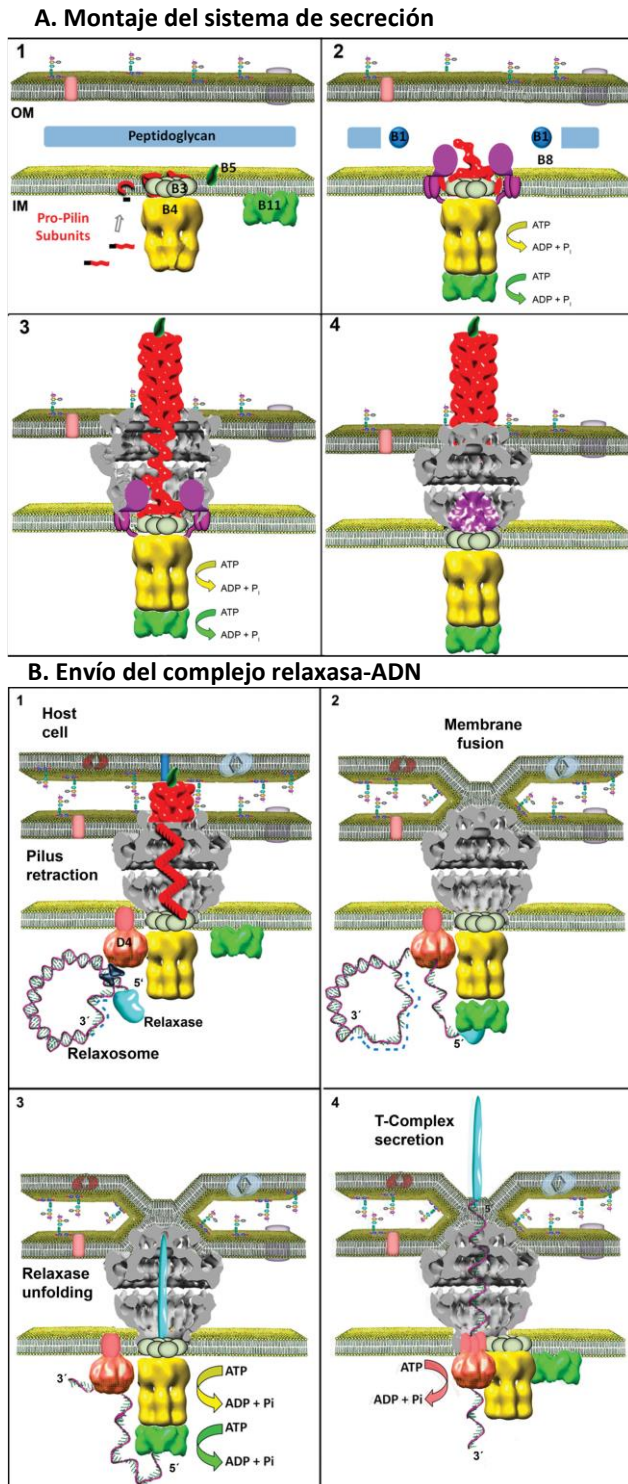


Figura 14. A) Montaje del sistema de secreción tipo 4. Las ATPasas *VirB4* y *VirB11* (*TrwK*, (amarilla) y *TrwD* (en verde) en R388) aportan la energía necesaria para la secreción de los componentes *VirB3*, 4, 6, 7, 8, 9 y 10 que forman el complejo central entre las dos membranas (*TrwEFGHIM* (gris) en R388), también se secretan *VirB1* (*trwN* (azul) en R388) al periplasma, y *VirB2* y *VirB5* (*TrwL* (rojo) y *TrwJ* (verde oscuro) en R388) que forman el pilus, que entra en contacto con la membrana externa de la célula receptora. B) Envío del complejo ADN-relaxasa: relaxasa (azul claro), proteínas accesorias (azul oscuro) y proteína acopladora *VirD4* (*TrwB* en R388, en rosa). Se cree que la sustitución de *TrwD* por *TrwB* cambia entre los dos "modos de trabajo". (Tomado de Cabezón *et al.* 2015).,

2008)), que se exporta por el complejo central del T4SS, con gasto de ATP, y pone en contacto las células donadora y receptora (Wallden, Rivera-Calzada and Waksman, 2010). Una de sus dos componentes (la pilina) forma la casi totalidad de la estructura en forma de broca hueca (Costa *et al.*, 2016), mientras que la otra (la adhesina) tiene un papel aún controvertido pese a haber sido extensamente estudiada (Schmidt-Eisenlohr, Domke and Baron, 1999; Yeo *et al.*, 2003; Aly and Baron, 2007; Lacroix and Citovsky, 2011; González-Rivera *et al.*, 2019), pero se sabe que está presente en la membrana externa, en la base y en la punta del pilus y que parece actuar como determinante de adhesión, de reconocimiento de receptores y como diana para algunos fagos (Bradley, 1979; Meng *et al.*, 2019).

El T4SS cuenta además con una proteína glicolítica que es exportada al periplasma, allí probablemente digiere en parte la matriz de glicoproteínas para facilitar el montaje del complejo central (Höppner *et al.*, 2005).

La **proteína acopladora** es una proteína con función ATPasa, generalmente codificada en el mismo operón que la relaxasa, que se une al relaxosoma ayudado por las proteínas Rap una vez la relaxasa está unida covalentemente con el extremo 5' del nic. En ese momento transporta el complejo nucleoproteico y lo pone en contacto con el sistema de secreción, momento en el que da comienzo el bombeo del sistema relaxasa-ADN a través del *core complex* y del *pilus* hasta la célula receptora. En ese momento comienza la replicación en círculo rodante de la hebra no mellada. Para poder atravesar el estrecho poro del complejo central del T4SS, la relaxasa debería ser desplegada, aunque no se conoce bien el mecanismo por el que esto podría suceder (Cabezón *et al.*, 2015). En el plásmido R388, la proteína acopladora es **TrwB**, una proteína de unos 500 aminoácidos, con una hélice transmembrana que la mantiene anclada a la membrana interna, formando una estructura en anillo hexamérico (Gomis-Rüth *et al.*, 2001). Tiene actividad ATPasa (es una ATPasa tipo Walker, (Gomis-Rüth *et al.*, 2001; Hormaeche *et al.*, 2002; Tato *et al.*, 2005)), potenciada por TrwA (Tato *et al.*, 2007), que se piensa sirve para aportar la energía necesaria para el transporte activo del DNA plasmidico hasta la célula receptora (Willett and Wilkins, 1984).

Una vez que el DNA es transportado a la célula receptora, la relaxasa vuelve a reconocer el *oriT*, y realizando una nueva reacción de transesterificación recirculariza la hebra sencilla de ADN (Draper *et al.*, 2005; Garcillán-Barcia *et al.*, 2007). En ese momento se cree que las proteínas del nuevo hospedador generan la hebra complementaria.

Los **sistemas de exclusión de entrada y de superficie**: son genes muy cortos, compartidos por todos los plásmidos conjugativos (evolucionan mucho más rápido que el resto de los genes de la región *tra*), que evitan que un hospedador que ya porta un plásmido reciba copias idénticas del mismo. El mecanismo por el que actúan es un misterio, ya que se ha descrito localizadas en la membrana interna y, sin embargo, las evidencias apuntan a que interaccionan o con la proteína acopladora o con la VirB6, una proteína de membrana interna en el complejo central del T4SS. En cada plásmido conjugativo actúa con una intensidad (factor de exclusión) distinta, que es dosis-dependiente. Hay varias hipótesis sobre su papel biológico: para evitar un exceso de recombinación que amenazaría la pervivencia del plásmido; para competir con otros plásmidos del mismo grupo Inc o bien para evitar la "zigosis letal" o descenso del fitness sobre el hospedador debido a un exceso de eventos de conjugación (Garcillán-Barcia and de la Cruz, 2008), probablemente sea una combinación de todas ellas.

Además, en el plásmido R388 existe un grupo de proteínas implicadas en la segregación del plásmido que también participan en la conjugación (Guynet *et al.*, 2011). El **operón *stbABC*** es

un operón compuesto por tres genes (uno de ellos, *stbC*, sin función ni homólogos conocidos) presente en algunos plásmidos conjugativos (en R388 y pKM101, los plásmidos que más vamos a emplear en este trabajo presentan un alto grado de homología y sintenia), y al que se le han atribuido funciones de transporte y distribución homogénea del plásmido, actuando quizás, como conexión entre el sistema de herencia vegetativa y la transferencia horizontal. StbA podría estar uniendo el plásmido al cromosoma, manteniéndolo cerca del centro y favoreciendo así una correcta segregación, mientras que StbB parece secuestrar el plásmido y acercarlo a la membrana y los polos, favoreciendo el inicio de la conjugación. La delección de *stbA* reduce la estabilidad de R388 y la delección de *stbB* elimina su capacidad para conjugar (Guynet *et al.*, 2011).

1.6.2. Organización transcripcional de la region TRA

En el plásmido R388 (y otros plasmidos relacionados filogenéticamente, como pKM101) los 14 genes de la región *tra* están repartidos en tres operones: un operón *dtr* y dos operones *mpf*. Todos ellos están regulados por represores específicos (Lambertsen *et al.*, 2004; del Campo *et al.*, 2012; Fernandez-Lopez and de la Cruz, 2014; Fernandez-Lopez *et al.*, 2014). El **operón *mob* o *dtr*** agrupa los tres genes del relaxosoma. Está reprimido por la acción de la proteína TrwA, que se une al promotor del operón, solapado con la secuencia *oriT* (Moncalián *et al.*, 1997).

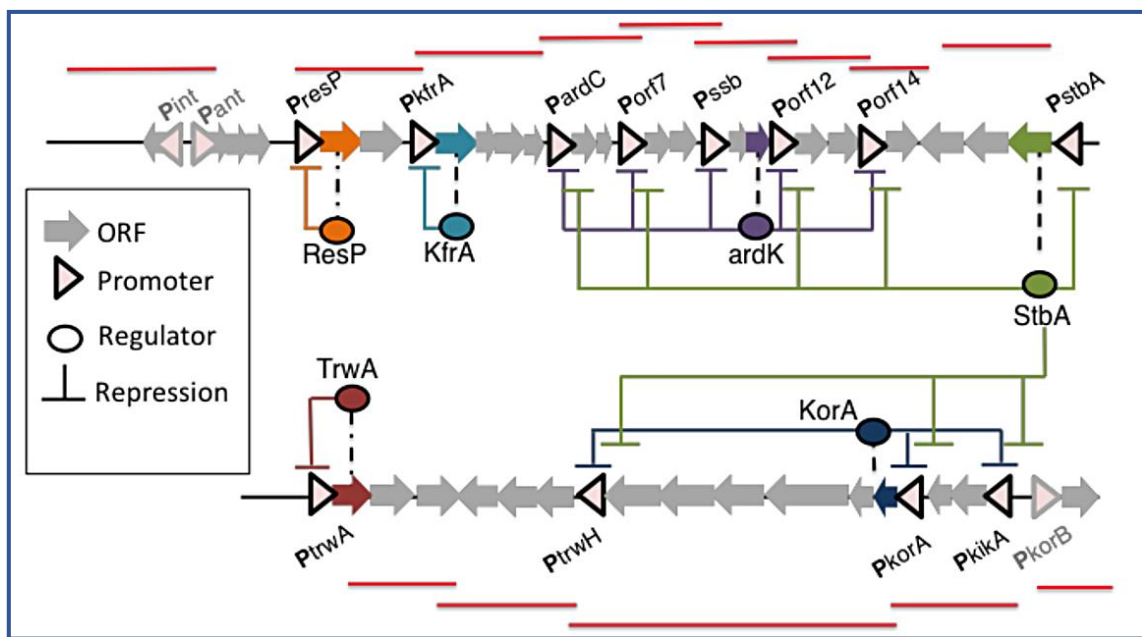


Figura I 5. Red de regulación global del plásmido modelo R388. Se detalla el mapa de secuencia del plásmido R388 partido en dos secciones, la de arriba abarca la secuencia desde el *oriT* hasta el integrón, incluyendo los operones de estabilidad, mantenimiento, replicación y resistencias a antibióticos; la secuencia de abajo es el mapa que corresponde a la región *tra*. Los triángulos indican la posición y orientación de los promotores de cada operón, las flechas indican los genes, las líneas rojas indican los operones que expresa cada promotor. En color, aquellos genes que codifican para represores transcripcionales, las elipses de color son dichos represores transcripcionales, y se indica con una línea del mismo color los promotores que reprime cada uno. Así, podemos ver que los operones de conjugación están sujetos a represión por KorA y StbA sobre los promotores PkikA, PkorA y PtrwH. Asimismo, el operón *dtr* está auto-reprimido. (Tomado de Fernandez-Lopez 2014).

Los genes de la región *mpf* se organizan en tres operones: [*kikA* + *trwN*], [*korA* + *trwLMKJI* + *eex*] y [*trwHGFED*], todos ellos regulados por la acción concertada del represor *KorA* y por *StbA* en menor medida. Dado que las secuencias que codifican para ambos represores transcripcionales entran en la célula receptora durante la conjugación antes que las secuencias que codifican para la mayor parte de la región *tra* (los genes que regulan), hay motivos para pensar que los genes *mpf* desde *trwM* hasta *trwD* se expresan durante muy poco tiempo, antes de quedar reprimidos por *KorA* y *StbA*. Dado que los promotores de los operones de *trwA*, *stbA* y *korA* están sujetos a un bucle de retroalimentación negativo se dice que estos operones experimentan “overshooting” (una “explosión” en la producción de mRNAs que es rápidamente reprimida para evitar un gasto metabólico excesivo (Fernandez-Lopez *et al.*, 2014; Rabani *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2018)).

Esta organización transcripcional aparece conservada en otros plásmidos emparentados filogenéticamente con el grupo IncW. Por ejemplo, los plásmidos de la familia IncN muestran una arquitectura idéntica, con proteínas de regulación también homólogas a las de R388 (Bolland *et al.*, 1990; Moré, Pohlman and Winans, 1996; Fernández-López *et al.*, 2006).

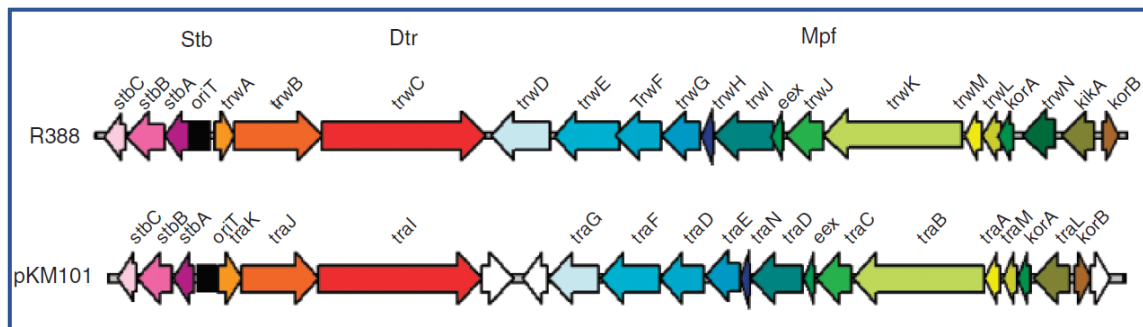


Figura I 6. Organización de los genes implicados en la conjugación de los plásmidos R388 (arriba) y pKM101(abajo). Se indican las regiones de estabilidad (Stb), relaxosoma (dtr) y formación del sistema de secreción (mpf). Las flechas indican los genes codificados en cada región, con el inicio en la base de la flecha y el final en la punta. Se han coloreado de la misma forma aquellos genes que presentan la misma función en cada plásmido conjugativo. Se puede observar así que, salvo la inserción de dos genes entre las regiones *dtr* y *mpf* (genes *nuc* y *fipA*, en blanco) en pKM101, la sintenia entre ambos plásmidos es casi completa.

1.6.3. Estructura del sistema de secreción

Los sistemas de secreción de R388 y de pKM101 han sido resueltos en distinta medida, aunque su *pilus* rígido, grueso y posiblemente corto ($\approx 0.5 \mu\text{m}$) nunca ha podido ser caracterizado en ninguno de los dos plásmidos, solo el del plásmido F, que es fino, largo, flexible y retráctil lo que le permite entrar en contacto con potenciales receptores en líquido o a través de un filtro (Harrington and Rogerson, 1990) e incluso a distancias de $12 \mu\text{m}$ (Babić *et al.*, 2008) y atraer al receptor una vez establecido el contacto (Clarke *et al.*, 2008).

El sistema de secreción comprende ocho proteínas en el núcleo y cuatro accesorias. El núcleo o “core complex” se extiende por las dos membranas formando un cilindro de simetría C14 con un poro central (Fronzes *et al.*, 2009)). El montaje de este núcleo está finamente sincronizado, con una estequiometría precisa entre sus componentes (Low *et al.*, 2014) de tal forma que la ausencia de cualquiera de los genes de la región *mpf* inhibe la construcción del sistema (Schmidt-Eisenlohr, Domke and Baron, 1999). Además, la complementación *en trans* de cualquiera de los genes no consigue recuperar la eficiencia de conjugación natural (Larrea *et al.*, 2013).

Aunque algunos plásmidos conjugativos parecen tener preferencias por establecer el sistema de secreción en algunas posiciones determinadas ($\frac{1}{4}$ y $\frac{3}{4}$ de la longitud de la bacteria, para los plásmidos R751 y pWWO, (Lawley *et al.*, 2002; Seoane *et al.*, 2011), o cerca de los polos para R388, (Guynet *et al.*, 2011) esto todavía no está asentado y parece variar entre plásmidos conjugativos.

El sistema canónico está formado por tres proteínas que actúan como andamio: TrwE, que abarca todo el espacio periplásmico insertándose en la membrana interna y en la externa y sirve de reconocimiento para la proteína acopladora; TrwH y TrwF. Catorce unidades de cada uno de estos tres, en proporciones 1:1:1 forman el poro en la membrana externa (Low *et al.*, 2014). En la membrana interna las proteínas TrwG, TrwI y TrwM forman el poro interno, junto con la ATPasa TrwK que parece actuar bombeando el complejo ADN-relaxasa a través del poro (Arechaga *et al.*, 2008; Peña *et al.*, 2012).

En una primera etapa el sistema de secreción sirve para secretar las proteínas 1) que acaban formando el complejo central, 2) la transglicosilasa TrwN que degrada parcialmente el periplasma y 3) el pilus (TrwJ y TrwL). La proteína TrwD, otra ATPasa hexamérica, sería la responsable de cambiar entre el modo de “montaje del pilus” y el modo de “envío de material” por el sistema de secreción (Sagulenko *et al.*, 2001; Ripoll-Rozada *et al.*, 2013). Los derivados de ácidos grasos inhibidores específicos de la conjugación de R388 (Fernandez-Lopez *et al.*, 2005; Ripoll-Rozada *et al.*, 2016; Getino and de la Cruz, 2018) parecen actuar inhibiendo específicamente esta proteína.

Este complejo parece ser suficiente para llevar a cabo la conjugación, incluso delecciones importantes de las regiones extracelulares más expuestas del poro siguen permitiendo la conjugación (Gordon *et al.*, 2017).

El pilus: El complejo central exporta los componentes que forman en sí el pilus: TrwL o pilina y, posiblemente TrwJ o adhesina. No se conoce la estructura del pilus de R388 ni de pKM101, porque la pilina parece mostrar problemas de toxicidad cuando se intenta sobreexpresar. De hecho, en ensayos de coevolución entre el plásmido pB10 (IncP) y dos especies de enterobacterias se observó que una sola mutación en la pilina incrementaba el rango de hospedadores y aumentaba significativamente el fitness de éstos con respecto a los que portaban el plásmido natural, aumentando además la eficiencia de conjugación (De Gelder *et al.*, 2008).

No obstante, la estructura del pilus del plásmido F (ver Figura 17, Costa *et al.*, 2016) tiene varias características interesantes que quizás sean compartidas por el pilus de R388 y de pKM101: la pilina forma 5 hélices intrincadas formando una suerte de “broca” en cuyos surcos se alojan moléculas de fosfolípidos con las cabezas polares hacia dentro del poro (reduciendo la carga relativa del mismo y favoreciendo el paso del complejo relaxasa-ADN a través del mismo) y las colas apolares hacia el exterior, lo que podría apoyar la hipótesis de que las membranas externas de donador y receptor se fusionan durante la conjugación.

En el caso de pTi se ha demostrado que se puede desacoplar la formación del pilus respecto de la conjugación (Sagulenko *et al.*, 2001). En pKM101 también se vio que el mutante de la adhesina pKM101 Δ traC no permitía la formación del pilus, pero sí que se llevase a cabo la conjugación (Gordon *et al.*, 2017). Esto último se debe a que se ha descubierto que pKM101 cuenta con una segunda adhesina, codificada por el gen *pep* (González-Rivera *et al.*, 2019).

Las adhesinas de R388 y pKM101 muestran una gran homología de secuencia, son proteínas pequeñas (220 aminoácidos) con dos regiones conservadas: una de unión al *pilus* y otra que posiblemente sirva de unión a los receptores en la conjugación (Yeo *et al.*, 2003). Junto con TrwE, parecen haber evolucionado por separado del resto de componentes de la región *tra* (Fernández-López *et al.*, 2006). Parecen actuar como sitios de unión para los fagos *pilus*-específicos (Bradley, 1979; Grahn *et al.*, 1997), identificando a los receptores para la conjugación (Aly and Baron, 2007) y son secretados por el complejo central (Schmidt-Eisenlohr, Domke and Baron, 1999), han sido observados uniéndose tanto a la base como a la punta del *pilus*. En pKM101 se ha descrito que forma unas estructuras en la membrana externa junto con la proteína Pep (González-Rivera *et al.*, 2019) que intervendrían en el reconocimiento y quizás incluso la fusión de las membranas de donadores y receptores. La secreción de adhesina al medio extracelular desde el receptor o desde una cepa ayudante incrementa la eficiencia de conjugación (Lacroix and Citovsky, 2011), pero no la adhesión al receptor.

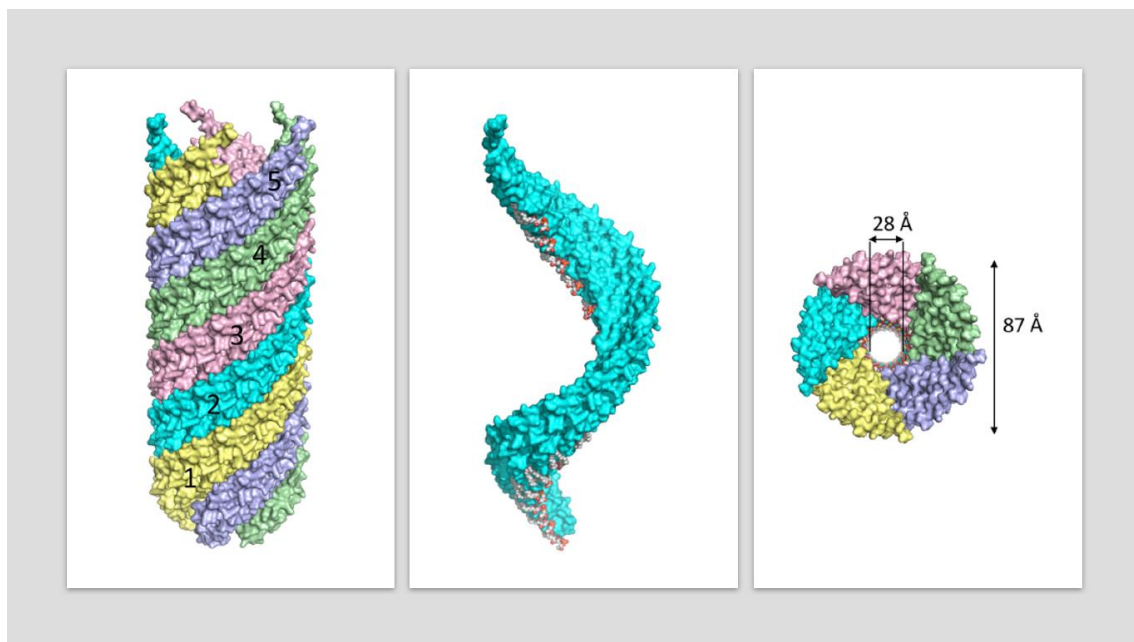


Figura 17. Estructura en 3D parcial del pilus del plásmido pED208, homólogo del plásmido F. Sólo se detalla el acoplamiento de todas las unidades monoméricas de pilina, unidas al fosfolípido (en rojo y gris en la figura central). A la izquierda, vista lateral de la estructura del pilus, compuesto por 5 subunidades en hélice idénticas (verde, azul oscuro, amarillo, azul claro y rosa), en el centro una sola de estas subunidades, compuesta a su vez por casi 13 monómeros de pilina por cada vuelta completa. A la derecha vista cenital del pilus, en la que se aprecian los residuos de fosfatidilglicerol, con la cabeza polar expuesta en el lumen. (Tomado de Costa *et al.* 2016).

1.6.4. Movilización y conjugación

Los plásmidos se dividen en dos grandes grupos en función de su movilidad: movilizables o no movilizables. Para ser movilizable un plásmido debe poseer una secuencia *oriT* que pueda ser reconocida y cortada por una relaxasa y ser transportado por conjugación (esto no incluye el transporte por conducción descrito originalmente como un efecto inespecífico y casi anecdótico de co-transporte de otros plásmidos no movilizables durante la conjugación, (Clark and Warren, 1979; Goto *et al.*, 1984).

Dentro de los plásmidos movilizables podemos establecer una segunda distinción: plásmidos movilizables (que poseen al menos un *oriT*, pero no poseen la maquinaria conjugativa completa, esto es: genes *dtr* y *mpf*), y plásmidos conjugativos o auto-transmisibles, que codifican para

todos los genes necesarios para expresar toda la maquinaria conjugativa. Esto significa que un plásmido, para ser transportado por conjugación sólo necesita poseer una secuencia *oriT* y que, en el donador, se expresen todos los genes necesarios para la conjugación (Smillie *et al.*, 2010; Cabezón *et al.*, 2015). Hasta hace poco se pensaba que para poder ser movilizable era fundamental portar la secuencia *oriT* y los genes *rel* y *rap* (Francia *et al.*, 2004), pero hace poco se ha demostrado que existe toda una gama de plásmidos que portan el *oriT* y, como mucho, unas proteínas accesorias *rap* (Moran and Hall, 2017; Ramsay and Firth, 2017; Barry *et al.*, 2019).

Como veremos más adelante, portar toda la maquinaria conjugativa implica un gasto energético importante para el hospedador (Bentley *et al.*, 1990; Haft, Mittler and Traxler, 2009; Humphrey *et al.*, 2012; San Millan and MacLean, 2017), que puede hacer que sea menos competitivo frente a otros individuos que pueblan el medio y que se reproducirán más rápido (a la diferencia relativa entre el fitness de un hospedador que porta un plásmido y otro que no lo hace lo llamaremos de aquí en adelante “burden” o carga).

Existen varias formas de sortear este problema, las más obvias son reprimir los genes de la región *tra* (Lambertsen *et al.*, 2004; Fernandez-Lopez *et al.*, 2014; Koraimann and Wagner, 2014) o directamente perder todos los genes que generan ese burden (Porse *et al.*, 2016) y conservar la cantidad mínima que asegure la posibilidad de ser movilizado, aunque para ello haya que contar con la maquinaria conjugativa de otro plásmido conjugativo. Se cree que esta estrategia (o bien la alternativa: ser un plásmido no movilizable y adquirir por HGT sólo las secuencias necesarias para ser movilizable) es la que da lugar a los plásmidos movilizables no conjugativos.

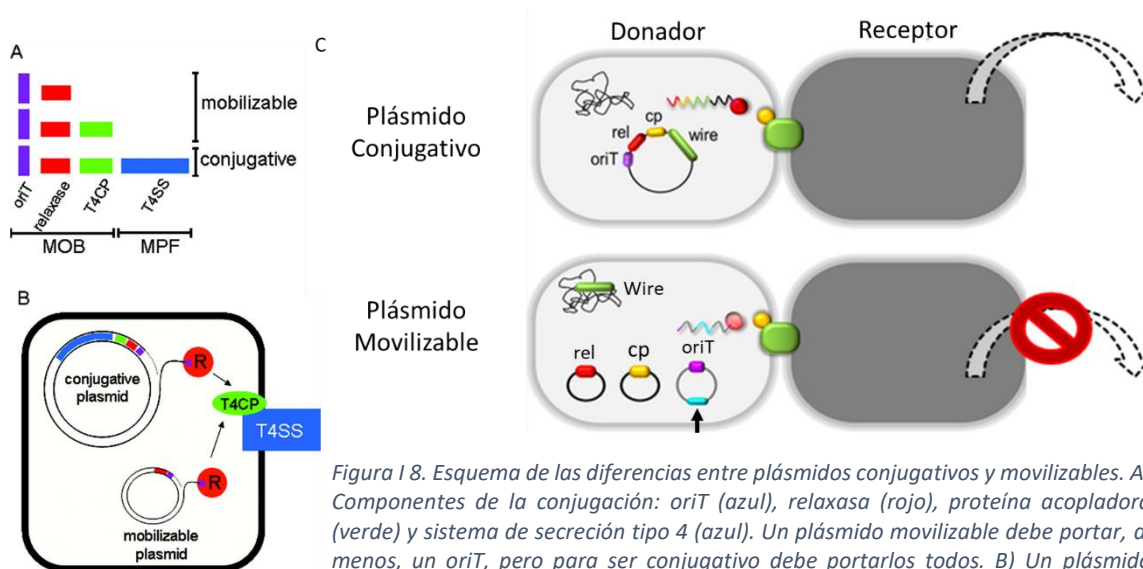


Figura 18. Esquema de las diferencias entre plásmidos conjugativos y movilizables. A) Componentes de la conjugación: *oriT* (azul), relaxasa (rojo), proteína acopladora (verde) y sistema de secreción tipo 4 (azul). Un plásmido movilizable debe portar, al menos, un *oriT*, pero para ser conjugativo debe portarlos todos. B) Un plásmido conjugativo puede transmitirse por conjugación, un plásmido movilizable, abajo, puede emplear la maquinaria del plásmido conjugativo para ser movilizado. C) El plásmido conjugativo (arriba) puede, una vez ha llegado al receptor, seguir conjugando desde allí, mientras que el movilizable, abajo señalado con una flecha negra, no puede. En esta cepa se han separado los 4 componentes en 3 plásmidos y una inserción cromosómica, pero solo el plásmido movilizable puede ser transmitido por conjugación. (*wire*=*T4SS*). (Adaptado de Smillie 2010).

En experimentos de coevolución de un plásmido conjugativo con una sola especie hospedadora se ha observado que los plásmidos tienden a limitar su eficiencia conjugativa y a aliviar el burden sobre su hospedador (Dahlberg and Chao, 2003; Dionisio *et al.*, 2005; Harrison and Brockhurst, 2012), aunque en ocasiones conservan o incluso aumentan la eficiencia a costa de perder otros

genes “sociales” como las resistencias a antibióticos (Turner, Cooper and Lenski, 1998) o al adquirir sistemas de adicción molecular (Loftie-Eaton *et al.*, 2016). Sin embargo, perder toda la región *tra*, y así la capacidad de ser movilizado, conduce a la extinción en pocas generaciones (Sia *et al.*, 1995).

Es posible que los plásmidos no movilizables más pequeños hayan sido originados en ese mismo proceso de corte, perdiendo también el *oriT*. Sin embargo, la causa de su pervivencia en ausencia de selección positiva en la naturaleza es un aspecto controvertido aún en la biología de plásmidos (Stewart and Levin, 1977; Levin and Stewart, 1980; Bergstrom, Lipsitch and Levin, 2000) y, aunque quizás la clave esté en la coevolución con sus hospedadores (Bouma and Lenski, 1988; Modi and Adams, 1991) o en la convivencia con plásmidos conjugativos de mayor tamaño (Millan *et al.*, 2014), aún hace falta avanzar en la comprensión de esta paradoja.

Curiosamente, los plásmidos más grandes conocidos (los mayores de 300 kb) han perdido la capacidad de movilizarse por conjugación casi por completo también, aunque quizás la causa de su pervivencia sea un cúmulo de factores: sistemas de adicción molecular (Hayes, 2003), adquisición de genes esenciales (Fang, Rocha and Danchin, 2005) o la conversión progresiva en cromosomas secundarios o “crómidos” (Harrison *et al.*, 2010).

La posibilidad de transmitir plásmidos aportando los componentes necesarios en *trans* es la base del proyecto Plaswires, motivo fundamental del presente trabajo, que se describe con mayor detalle más adelante.

1.7. Métodos experimentales de medida de la conjugación

Los métodos experimentales de conjugación de plásmidos se pueden dividir entre métodos indirectos y métodos directos. Los métodos indirectos son todos aquellos destinados a monitorizar el efecto de la transmisión horizontal genética en poblaciones, empleando para ello el rastro filogenético que han dejado los plásmidos sobre los genomas de sus hospedadores y viceversa, obteniendo así árboles filogenéticos (Campbell, Mrázek and Karlin, 1999; van Passel *et al.*, 2006; Garcillán-Barcia, Francia and De La Cruz, 2009; Smillie *et al.*, 2010; Suzuki *et al.*, 2010; Guglielmini, De La Cruz and Rocha, 2013; Carattoli *et al.*, 2014; Lanza *et al.*, 2014). Los métodos directos son todos aquellos que estudian *in situ*, en un ambiente controlado, la transmisión de uno o varios plásmidos y su efecto en una población.

Estos métodos directos pueden ser, a su vez, cualitativos o cuantitativos. Los cualitativos suelen analizar la coadaptación de plásmidos y hospedadores al medio, la invasión de biofilms y a otros ecosistemas (Krone *et al.*, 2007; Seoane *et al.*, 2011; Hall *et al.*, 2016) y suelen emplear plásmidos con marcadores fluorescentes y técnicas de microscopía de fluorescencia (Gordon, 1992; Christensen, Sternberg and Molin, 1996; Lawley *et al.*, 2002; Sørensen *et al.*, 2005; Pinilla-Redondo *et al.*, 2018). Los cuantitativos recogen medidas precisas de las poblaciones con o sin plásmidos, a menudo a lo largo del tiempo y en distintas condiciones. Como el número de trabajos en este campo es muy extenso y parte de esta tesis es la puesta a punto de un protocolo de medida cuantitativa de la eficiencia de conjugación, nos extenderemos algo más en la siguiente sección.

1.7.1 Métodos cuantitativos de medida de la conjugación

Pese a que la conjugación de plásmidos fue descrita hace ahora más de 70 años (Lederberg and Tatum, 1946)), y que, como se ha descrito más arriba, cobra cada día mayor importancia, no existe un protocolo estándar adecuado para medir y comparar la eficiencia de conjugación de los plásmidos conocidos. Esto se debe a varios factores:

1. La eficiencia de conjugación de plásmidos varía enormemente entre bacterias gram positivas y negativas, entre géneros (Christensen *et al.*, 1998), especies (Lilley and Bailey, 2002; Kottara *et al.*, 2018), e incluso entre cepas de una misma especie (Gordon, 1992; Dionisio *et al.*, 2002; Anjum *et al.*, 2018; Dimitriu *et al.*, 2019; Kneis, Hiltunen and Heß, 2019).
2. La eficiencia de conjugación en una misma cepa varía muchísimo entre plásmidos, incluso entre aquellos de un mismo grupo de incompatibilidad o entre miembros de una misma familia MOB o MPF (Bradley, Taylor and Cohen, 1980; Lundquist and Levin, 1986; Reisner, Wolinski and Zechner, 2012; Król *et al.*, 2013; Gama, Zilhão and Dionisio, 2017b; Getino *et al.*, 2017).
3. Algunos plásmidos están especializados para conjugarse en líquido y otros sobre superficies sólidas (Bradley, Taylor and Cohen, 1980). La eficiencia varía ampliamente (y suele ser mucho menor) si la conjugación se realiza en entornos naturales como la fitosfera (Knudsen *et al.*, 1988; Normander *et al.*, 1998), aguas dulces (Bale, Fry and Day, 1987) o residuales (Jacquiod *et al.*, 2017), el intestino de mamíferos (Freter, Freter and Brickner, 1983; Licht *et al.*, 1999; Anjum *et al.*, 2018), el suelo (Daane, Molina and Sadowsky, 1997; Hall *et al.*, 2016) o los biofilms (Christensen *et al.*, 1998; Hausner and Wuertz, 1999; Lilley and Bailey, 2002; Molin and Tolker-Nielsen, 2003; Stalder and Top, 2016a). En estos últimos además se ha demostrado que la eficiencia varía mucho con la distancia a la superficie del biofilm.
4. Relacionado con el punto 3, en los experimentos de conjugación sobre superficies sólidas o semi-sólidas se ha observado sistemáticamente que, después de un primer contacto entre colonias confluentes de donadores y receptores hay un incremento de la eficiencia de conjugación que genera una “frontera” de transconjugantes entre ambas colonias, tras lo cual la eficiencia desciende bruscamente y la colonia de receptores no llega a ser nunca totalmente invadida (Simonsen *et al.*, 1990; Christensen, Sternberg and Molin, 1996; Christensen *et al.*, 1998; Lagido *et al.*, 2003; Reisner, Wolinski and Zechner, 2012). Esto no sucede así si existe un proceso de mezcla periódico (Fox *et al.*, 2008), o si la mezcla de conjugación sobre la superficie permitía el contacto de todos los D y R desde el primer momento (Król *et al.*, 2013).
5. Algunos presentan una eficiencia única de conjugación mientras que otros pueden incrementarla temporalmente (Meynell and Datta, 1967; Levin, Stewart and Rice, 1979; Freter, Freter and Brickner, 1983; Lundquist and Levin, 1986; Simonsen *et al.*, 1990; Seoane *et al.*, 2011), y en todos los plásmidos ésta comienza a reducirse hasta llegar a cero después de 2-10 horas (Clark and Adelberg, 1962; Levin, Stewart and Rice, 1979; Freter, Freter and Brickner, 1983; MacDonald, Smets and Rittmann, 1992; Licht *et al.*, 1999; del Campo *et al.*, 2012), lo que algunos han relacionado con la disponibilidad de nutrientes y capacidad de crecimiento de donadores (Fisher, 1957) y receptores (Licht *et al.*, 1999; Merkey *et al.*, 2011).
6. Incluso usando el mismo plásmido, cepa donadora y receptora y el mismo procedimiento experimental, la eficiencia de conjugación es modulable por varios factores: otros plásmidos cohabitando la población de donadores (Sagai, Uyobe and Mitsunashi, 1977; Harrison and Brockhurst, 2012; Gama, Zilhão and Dionisio, 2017a, 2017c; Getino and de la Cruz, 2018; Dionisio, Zilhão and Gama, 2019) o de receptores (Garcillán-Barcia and de la Cruz, 2013; Gama,

Zilhão and Dionisio, 2017b), expresión de sistemas CRISPR-Cas y restricción-modificación en el receptor que digieren el plásmido al entrar (Getino, 2016), disponibilidad de oxígeno (Fisher, 1957) y nutrientes (Simonsen *et al.*, 1990; MacDonald, Smets and Rittmann, 1992; Lilley and Bailey, 2002), y factores de estrés ambiental (Schafer, Kalinowski and Puhler, 1994; Zhang *et al.*, 2013; Zeng, Ardeshtna and Lin, 2015).

7. Los plásmidos conjugativos pueden llegar a un receptor desde el donador (Conjugación primaria) o desde un transconjugante (conjugación secundaria), convertido en donador. Las eficiencias de ambos procesos pueden no ser iguales (no lo son para los plásmidos de-reprimibles (Freter, Freter and Brickner, 1983; Lundquist and Levin, 1986; Simonsen *et al.*, 1990) y habría que poder cuantificar ambas por separado. Además, puede que exista un período de transición desde que un donador envía un plásmido hasta que puede mandar el siguiente, y desde que un receptor pasa a transconjugante y de transconjugante pasa a donador (Lagido *et al.*, 2003; Seoane *et al.*, 2011), los plásmidos movilizables sólo pueden realizar conjugación primaria (Levin and Stewart, 1980). El resultado de no tener esto en cuenta es una estimación incorrecta de la eficiencia de conjugación (Zhong *et al.*, 2012).

8. La variedad de posibles receptores para la conjugación es siempre mayor que la variedad de receptores en los que puede replicar dicho plásmido después de haber entrado (rango de hospedador) y a su vez ésta es mayor que la variedad de receptores en los que puede pervivir a medio o largo plazo (Simonsen, 1991; Bergstrom, Lipsitch and Levin, 2000). Así, siempre es mayor el número de eventos de conjugación que el número de transconjugantes medidos por plaqueo (Pinedo and Smets, 2005) o por citometría (del Campo *et al.*, 2012).

Las **medidas de eficiencia** o frecuencia de conjugación (FC) varían así de un artículo a otro: Watanabe (Watanabe and Fukasawa, 1961) mide transconjugantes entre portadores de plásmido, $FC = T/P^+$, Curtis (Curtiss, 1969) usa $FC = T/D$, Bale (Bale, Fry and Day, 1987) usa $FC = T/R$, Andrup (Andrup and Andersen, 1999) emplea $FC = V_{max} (T \cdot D^{-1} \cdot \text{minuto}^{-1})$, haciendo una analogía con la cinética enzimática), Pinedo (Pinedo and Smets, 2005) $FC = T/D \cdot R$, Gama (Gama, Zilhão and Dionisio, 2017b) $FC = \log \left(\frac{T}{\sqrt{D \cdot R}} \right)$, Dimitriu (Dimitriu *et al.*, 2019) incluye el tiempo t : $FC = T/D \cdot R \cdot t$. Todas estas medidas varían en función de la densidad inicial o de la proporción entre donadores y receptores y por ello se recomienda precaución al comparar resultados entre estudios que emplean estas medidas (Zhong *et al.*, 2012).

La medida de eficiencia de conjugación más robusta es la gamma del método de punto final (Simonsen *et al.*, 1990):

$$\gamma = \psi \ln \left(1 + \frac{T \cdot N}{D \cdot R} \right) \cdot \frac{1}{N - N_0} \quad (\text{Eq. 1})$$

donde ψ es la tasa de duplicación de la población (se supone equivalente para D, R y T) en unidades de h^{-1} . Todas las medidas son densidades, no cantidades de células totales, y la frecuencia de conjugación tiene unidades de $ml \cdot cél^{-1} \cdot h^{-1}$. Esta medida está extendida, pero también adolece de ciertos problemas, ya que es función de la densidad inicial, de la disponibilidad de nutrientes (MacDonald, Smets and Rittmann, 1992), de la estructura del medio (Licht *et al.*, 1999; Zhong *et al.*, 2012) y del método de medida (Sørensen *et al.*, 2005).

Por último es muy importante señalar que hay muchos artículos que no incluyen el tiempo de conjugación, la proporción D:R, la densidad del inóculo inicial, el crecimiento de la población ni la temperatura en sus medidas que, como veremos en la sección de resultados, son factores

imprescindibles para comparar dos medidas de eficiencia. Además hay que destacar que en ensayos de conjugación con plásmidos altamente conjugativos (casi siempre que se explicita) se emplean proporciones D:R = 1 y tiempos innecesariamente largos (>2h, generalmente 8-48 horas). Esto impide una medida precisa de la eficiencia de conjugación, dado que, como veremos, en menos de una hora algunos donadores ya no pueden encontrar nuevos receptores a los que conjugar, lo que lleva a una infraestimación sistemática de las eficiencias de conjugación (Levin, Stewart and Rice, 1979; Levin and Stewart, 1980; Gordon, 1992; de Paz *et al.*, 2005; Revilla *et al.*, 2008; Reisner, Wolinski and Zechner, 2012; Yano *et al.*, 2016; Gama, Zilhão and Dionisio, 2017b; Getino *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2018). Además, como ya se indicaba antes, la conjugación en medios sólidos o semi-sólidos se detiene a las 2 horas de comenzar.

1.8. Modelos epidemiológicos de propagación de infecciones

La epidemiología clásica distingue dos modos fundamentales de transmisión (Anderson and May, 1979; May and Anderson, 1979): la transmisión dependiente de densidad y la transmisión dependiente de frecuencia: si consideramos una población total N compuesta por infectados (donadores y transconjugantes (P^+), en nuestro caso) e infectables (receptores P^-), la cinética de transmisión será:

$$\frac{dP^+}{dt} = \lambda \cdot P^- \quad (\text{Eq. 2})$$

Donde λ indica la “fuerza de infección”: la probabilidad de que un P^- adquiera plásmido por unidad de tiempo. Asumiendo un medio con mezcla ideal perfecta, la fuerza de infección puede modelarse de dos formas distintas:

$$\frac{dP^+}{dt} = \gamma_a \cdot P^+ \cdot P^- ; (DDT) \quad (\text{Eq. 3a})$$

$$\frac{dP^+}{dt} = \frac{\gamma_f \cdot P^+ \cdot P^-}{N} ; (FDT) \quad (\text{Eq. 3b})$$

Donde DDT se emplea en infecciones en las que el factor limitante es la tasa de encuentros entre infectados e infectables (Begon *et al.*, 2002) y se asume que todo contacto es exitoso. Por otro lado, el modelo FDT sirve para modelar infecciones en las que el factor limitante es la habilidad de producir la transmisión una vez producido el contacto. Mientras que el primer modelo sirve para modelar infecciones transmitidas por aerosoles, el segundo sirve para modelar enfermedades de transmisión sexual. No obstante, la asunción de un modelo u otro puede ser una simplificación excesiva y está discutida para algunos modelos de enfermedad (de Jong, 1995; Volchenkov, Volchenkova and Blanchard, 2002; Ferrari *et al.*, 2011).

En realidad, ambos modelos son no excluyentes: idealmente un proceso de transmisión estará limitado por la tasa de encuentros a densidades suficientemente bajas, y la tasa de encuentros dejará de ser significativa a densidades suficientemente altas, por lo que ambos modelos responden a distintos rangos de concentración de individuos infectables, y lo interesante es conocer la densidad a la que sucede la transición entre un modelo y el otro.

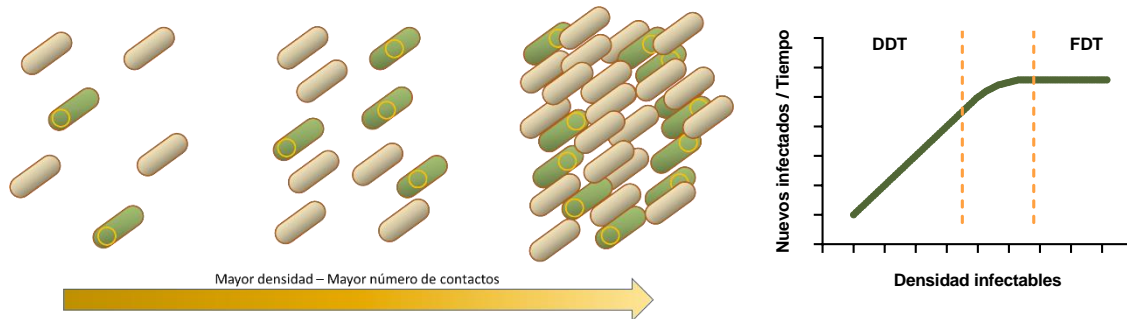


Figura 1 9. Variación de la densidad en una población de infectados (verde, con partícula infecciosa en amarillo) e infectables (en gris). En la gráfica de la derecha se representa el modelo clásico de Anderson y May según el cual la frecuencia de aparición de nuevos infectados (eje y) aumenta linealmente (DDT) con la densidad de infectables (eje x), hasta alcanzar una densidad de saturación o “plateau” en la que ya no aumentan la eficiencia con la densidad (FDT). Un aspecto interesante a determinar en la propagación de una infección es la transición entre ambos estados (región abarcada entre las dos líneas de puntos naranjas).

Los modelos de transmisión de plásmidos han asumido siempre que los plásmidos siguen un modo de transmisión dependiente de densidad (Levin, Stewart and Rice, 1979; Levin and Stewart, 1980; Freter, Freter and Brickner, 1983; Lundquist and Levin, 1986; Simonsen *et al.*, 1990; MacDonald, Smets and Rittmann, 1992; Bergstrom, Lipsitch and Levin, 2000; Zhong *et al.*, 2012; Hall *et al.*, 2016; Zwanzig *et al.*, 2019; Kneis, Hiltunen and Heß, 2019) y algunos resultados iniciales en líquido parecían confirmarlo (Bradley, Taylor and Cohen, 1980; Freter, Freter and Brickner, 1983; Wan *et al.*, 2011), sin embargo algunos trabajos comenzaron a discrepar con este modelo, especialmente cuando se trataba de trasladarlo a conjugación en biofilms o sobre superficies sólidas (Normander *et al.*, 1998; Licht *et al.*, 1999; Lagido *et al.*, 2003; Pinedo and Smets, 2005).

1.9. Modelos de transmisión en plásmidos

Existe un equilibrio entre las ventajas de portar toda la maquinaria conjugativa, pudiendo desplazarse entre hospedadores de forma autónoma y las desventajas de causar un gasto de energía al hospedador reduciendo su capacidad para reproducirse tan rápido como los individuos que no portan plásmido o lo han perdido por una segregación incorrecta (Nordstrom, 1989; Nordström and Gerdes, 2003) en ausencia de otra presión selectiva. Este equilibrio, en la ecología de plásmidos es conocido como el “equilibrio Stewart-Levin” por el artículo (Stewart and Levin, 1977) en el que estos autores establecen la siguiente desigualdad:

$$\gamma \cdot N > \alpha \cdot \rho + \tau \quad (\text{Eq. 4})$$

Donde γ es la eficiencia conjugativa (Levin 1979, que sería más tarde refinada en el “método de punto final” descrito arriba, Simonsen 1990), N la densidad de hospedadores posibles, α es la ventaja adaptativa de los individuos libres de plásmido, ρ es la tasa de mortalidad y τ la tasa de pérdida por defecto de segregación, a la que un hospedador pierde el plásmido. El lado izquierdo de la ecuación simboliza la transmisión horizontal del plásmido y el lado derecho la transmisión vertical.

Así, si un plásmido es movilizable, la tasa a la que se transmite horizontalmente debe estar en equilibrio con el daño causado al hospedador por esta transmisión, o si no (en ausencia de selección positiva) desaparecerá de la población. Por otro lado, los plásmidos no movilizables, cuya tasa de segregación siempre es mayor que cero, solo deberían existir si generan un α negativo, esto es: si producen un fenotipo ventajoso para el hospedador ya sea por expresar un gen beneficioso (por ejemplo, genes de resistencia a antibióticos) o por coadaptación (Harrison and Brockhurst, 2012).

Uno de los objetivos de esta tesis es arrojar algo de luz en este asunto, determinando la dinámica de transmisión de los plásmidos conjugativos. La epidemiología clásica distingue dos formas básicas de transmisión: dependiente de densidad o dependiente de frecuencia (Anderson and May, 1979; May and Anderson, 1979) aunque ahora se sabe que el panorama es más vasto (Ferrari *et al.*, 2011).

El equilibrio Stewart-Levin (Eq. 4) asume que la expansión de un plásmido en una población depende de la densidad de ésta. Los primeros ensayos parecían mostrar que la densidad en poblaciones naturales -dada la eficiencia conjugativa medida experimentalmente- no era tan elevada como para sostener el modelo de expansión parasitario (Simonsen, 1991) y, sin embargo, los plásmidos existen y parece que desde hace mucho tiempo (Lawrence, Ochman and Selander, 1998; Smillie *et al.*, 2010; Garcillán-Barcia and de la Cruz, 2013), así que no parece algo fortuito condenado a la extinción.

El primer modelo para un plásmido conjugativo expandiéndose en una población homogénea en líquido (Levin 1979) asumía una transmisión dependiente de densidad:

$$\begin{aligned}\frac{dR}{dt} &= \psi R - \gamma \cdot (D + T) \cdot R \\ \frac{dD}{dt} &= \psi D \\ \frac{dT}{dt} &= \psi T + \gamma \cdot (D + T) \cdot R\end{aligned}\tag{Eq. 5}$$

En este modelo, D, R y T expresan concentraciones y no cantidades de colonias. Se basa en las siguientes asunciones: 1) encuentros exitosos entre D-R o T-R proporcionales a la concentración de cada uno, 2) la pérdida por segregación defectuosa es negligible, 3) la transición T→D es instantánea, 4) γ es única y constante para D y R, 5) ψ es única para D, R y T. Otra asunción, no explícita, es que el fenómeno de transmisión es dependiente de densidad:

Un año después este modelo se ampliaría para abarcar también plásmidos movilizables no conjugativos (Levin 1980), y posteriormente se añadieron 1) tasa de reducción de R por recibir plásmido, 2) tasa τ de pérdida del plásmido por segregación ineficiente y por desplazamiento de la población por el burden causado en T, 3) tasa de inaccesibilidad de algunos R, 4) γ_1 y γ_2 que representan la de-represión transitoria observada en el plásmido R1 y 5) tasas de crecimiento diferenciales para D, R y T (Freter 1983, Lundquist 1986, Knudsen 1988).

Poco después se refina la medida de γ mediante “el método de punto final” (Simonsen 1990), y con este método se calcula una γ_D y γ_T distintas, función de la disponibilidad de nutrientes (McDonald 1992). Posteriormente se añadirían tiempos de retardo λ_i en la conversión T→D y desde que un donador conjuga una vez hasta que puede volver a conjugar (Wan *et al.*, 2011)

medido por Seoane 2011), durante ese período de recuperación el D “exhausto” se convierte en X:

$$\begin{aligned}
 \frac{dR}{dt} &= \psi_R \cdot R \cdot \left(1 - \frac{N}{K}\right) - \gamma_D \cdot D \cdot R \\
 \frac{dD}{dt} &= \psi_D \cdot D \cdot \left(1 - \frac{N}{K}\right) - \gamma_D \cdot D \cdot R + \lambda_T \cdot T + \lambda_X \cdot X \\
 \frac{dT}{dt} &= \psi_T \cdot T \cdot \left(1 - \frac{N}{K}\right) + \gamma_D \cdot D \cdot R - \lambda_T \cdot T \\
 \frac{dX}{dt} &= \psi_X \cdot X \cdot \left(1 - \frac{N}{K}\right) + \gamma_D \cdot D \cdot R - \lambda_X \cdot X
 \end{aligned}
 \tag{Eq. 6}$$

donde K es la cantidad máxima de células soportable por los nutrientes disponibles en el medio. Más adelante se incluyó la posibilidad de que los genes beneficiosos que porta el plásmido pasen al cromosoma, formando “cromosomales” C (Bergstrom, Lipsitch and Levin, 2000) que deberían invadir la población desplazando a D+T. El modelo continúa expandiéndose al incluir modelos geométricos que describen el crecimiento de colonias de D y R en superficies sólidas (Lagido *et al.*, 2003)), y se finaliza con la posibilidad de que algunos portadores de plásmido (D o T) desarrollen adaptación al plásmido y reduzcan al mínimo el burden causado por éste, convirtiéndose en “adaptados” A (Zwanzig *et al.*, 2019), ver tabla 1).

Las primeras discrepancias de la conjugación con el modelo de transmisión dependiente de densidad se debían al comportamiento aberrante de R1 al de-reprimirse en los transconjugantes y en la invasión en sólido de colonias R por un D portando R1drd19 (Simonsen *et al.*, 1990; Simonsen, 1991). Más adelante (Turner, Cooper and Lenski, 1998) demuestran que, efectivamente, los plásmidos conjugativos buscan una solución de compromiso entre la transmisión horizontal y la vertical, como ya habían predicho Anderson y May en 1979, pero, sorprendentemente, la transmisión no es dependiente de densidad como asume el modelo de acción de masas. Atribuyen a esta observación un posible error en la selección de transconjugantes, una superinfección de transconjugantes o a la reinfección de segregantes (ver figura I2). Después Licht demuestra que la transmisión de un plásmido no es DDT en biofilms ni en intestino de ratón (Licht *et al.*, 1999), y aunque Lagido (Lagido *et al.*, 2003) achaca los valores de γ demasiado bajos a un retraso en la capacidad conjugativa de los transconjugantes, se demuestra después (Pinedo and Smets, 2005; Zhong *et al.*, 2012) que el modelo de Levin solo funciona en líquido.

En las Eq. 6 y tabla 1 se presentan los dos modelos más completos empleando ecuaciones diferenciales ordinarias hasta el momento para predecir la expansión de un plásmido en una población. Ambos modelos son complementarios porque el de Wan 2011 no incluye la posibilidad de incluir la coadaptación hospedador-plásmido (la mortalidad está incluida en la tasa de duplicación individual), pero sí incluye los retardos y las eficiencias de conjugación y tiempos de replicación diferenciados entre D, R, X y T.

Tabla 1. Adaptada de Zwanzig 2019, el modelo consiste en tres ecuaciones diferenciales ordinarias que describen la producción con el tiempo de las especies F (células libres de plásmido), P (células portadoras de plásmido) y A (portadores de plásmido adaptados por coevolución), determinadas por las tasas de reacción para crecimiento, mortalidad, etc. f es la disponibilidad de nutrientes $1-(N/K)$, con K la cantidad máxima de células soportables por los nutrientes del medio. ψ es la tasa de crecimiento, α el burden ocasionado por el plásmido, β indica el grado de adaptación de P al plásmido, ω tasa de mortalidad natural, ν tasa de mortalidad por tratamiento con antibiótico, τ tasa de desaparición por segregación, χ tasa de adquisición de mutaciones adaptativas y γ la tasa de conjugación según método de punto final.

Proceso	Especie			Tasa de reacción
	F	P	A	
Crecimiento	1	0	0	$f \cdot \psi \cdot F$
	0	1	0	$f \cdot \psi \cdot (1 - \alpha) \cdot P$
	0	0	1	$f \cdot \psi \cdot [1 - \alpha (1 - \beta)] \cdot A$
Mortalidad	-1	0	0	$(\omega + \nu) \cdot F$
	0	-1	0	$\omega \cdot P$
	0	0	-1	$\omega \cdot A$
Segregación	1	-1	0	$f \cdot \tau \cdot \psi \cdot (1 - \alpha) \cdot P$
	1	0	-1	$f \cdot \tau \cdot \psi [1 - \alpha (1 - \beta)] \cdot A$
Conjugación	-1		0	$f \cdot \gamma \cdot F \cdot P$
	-1		1	$f \cdot \gamma \cdot F \cdot A$
Mutación	0	-1	1	$f \cdot \chi \cdot \psi (1 - \alpha) \cdot P$
	0	-1	1	$f \cdot \chi \cdot \gamma \cdot F \cdot P$

Cabe señalar que desde hace unos años se han explorado las posibilidades de las simulaciones computacionales, como los que emplean sistemas P (Pun and Rozenberg, 2002; Campos *et al.*, 2019) o los modelos tipo IbM (Individual Based Models) para el estudio de la transmisión de plásmidos en poblaciones, estos últimos permiten calcular trayectorias en el espacio y siguen el destino de cada individuo en una población en pasos de tiempo discretos, diferenciándose de los modelos basados en ecuaciones diferenciales, de forma paralela a como los métodos de seguimiento de la conjugación individuo a individuo usando microscopía de fluorescencia se diferencian de los métodos masivos de medición de eficiencia, basados en proporciones de poblaciones.

Introducidos por Sørensen en 2005, el primer ejemplo de un IbM aplicado a la modelización de sistemas conjugativos es de (Krone *et al.*, 2007), y se han ido refinando, incorporando cada vez más variables que los van haciendo más realistas (Werisch, Berger and Berendonk, 2017). Parte del proyecto Plaswires consistió en el desarrollo (en el Laboratorio de Inteligencia Artificial de la Universidad Politécnica de Madrid, dirigido por el Dr. A. R. Patón) de un IbM basado en el simulador gro (Gutiérrez Pescarmona, 2017) empleando parámetros obtenidos en nuestro laboratorio entre otros.

1.10. Coevolución plásmido-hospedador

Como hemos visto, la expresión de los genes *tra* supone una carga metabólica elevada para el hospedador (Haft, Mittler and Traxler, 2009; Baltrus, 2013; San Millan and MacLean, 2017), que se traduce en velocidades de crecimiento menores con respecto a los individuos que pierden el plásmido lo que debería llevarlos a la extinción a largo plazo (Levin and Stewart, 1980; Millan *et al.*, 2014). Dado que, sin embargo, la pervivencia de los plásmidos conjugativos en la naturaleza es patente y que la distancia filogenética entre ellos apunta a que llevan existiendo millones de años, en las últimas tres décadas se han hecho numerosos estudios de coevolución para dilucidar los mecanismos de adaptación entre plásmidos y hospedadores que han conducido a su pervivencia.

El primer ensayo en este sentido fue realizado por Bouma y Lenski en 1988 (Bouma and Lenski, 1988), empleando un plásmido no conjugativo (pACYC84) y una E.coli B, con selección por

antibiótico, dejándolos cohabitar durante unas 500 generaciones. Al principio del experimento, cargar con el plásmido suponía una reducción en la velocidad de crecimiento. Sin embargo, al final el hospedador había evolucionado hasta el punto de que portar el plásmido (evolucionado u original) mejoraba su velocidad de crecimiento con respecto a la velocidad inicial. Poco después se realizarían dos ensayos muy similares, pero sin emplear selección positiva durante la coevolución (Modi and Adams, 1991; Modi *et al.*, 1991), y se observó que la estrategia seguida por el sistema plásmido-hospedador (pBR322) fue perder genes de resistencia o reducir el número de copias del plásmido por célula hospedadora.

Después de éste se han realizado varios ensayos similares con plásmidos no movilizables (Ilhan *et al.*, 2019; Wein *et al.*, 2019) en los que el plásmido redujo el número de copias y la expresión de genes. En el primero, además, se registró adaptación en el cromosoma del hospedador. Por otro lado, varios ensayos realizados con el mini-replicón pMS0506 en otras especies (*P. moraviensis*, *S. oneidensis*) concentraban todas las mutaciones adaptativas en el gen *trfA1*, que codifica para la proteína de inicio de la replicación, pero causando en ocasiones un aumento del número de copias (Sota *et al.*, 2010; Hughes *et al.*, 2012; Loftie-Eaton *et al.*, 2016; Yano *et al.*, 2016). El aumento del número de copias de un plásmido puede hacerlo menos sensible a la pérdida por segregación (Durkacz and Sherratt, 1973; Nordstrom, 1989; Gordon and Wright, 2000) y adaptarse más rápido a la presencia de estrés ambiental (San Millan *et al.*, 2016), aunque también puede hacerlo evolucionar más despacio en ausencia de presión selectiva (Ilhan *et al.*, 2019) y provocar un descenso del fitness en su hospedador (San Millan and MacLean, 2017).

Por otro lado, cuando se hizo el mismo ensayo empleando plásmidos conjugativos se observan efectos adaptativos a primera vista contradictorios.

- Cuando sólo se emplea un plásmido y un hospedador (Turner, Cooper and Lenski, 1998; Dahlberg and Chao, 2003; Dionisio *et al.*, 2005; Heuer, Fox and Top, 2007; Porse *et al.*, 2016) se genera una codependencia plásmido-hospedador que lleva a reducir el burden a costa de que los genes “sociales” se pierden o silencian: en todos estos experimentos se redujo la eficiencia conjugativa del plásmido, ya fuera por silenciamiento o directamente por delección de la región *tra* completa (Porse *et al.*, 2016). Asimismo, se perdieron o silenciaron los genes de resistencia a antibiótico y se estrechó el rango de hospedador. Este efecto se acentúa cuando existen amenazas ambientales que generan cuellos de botella periódicamente, como la exposición de la población a fagos (Harrison, Jamie Wood, *et al.*, 2015).
- Cuando se emplea un plásmido y dos especies de hospedadores (De Gelder *et al.*, 2008; Hall *et al.*, 2016) sin embargo se estimula la promiscuidad del plásmido: su eficiencia conjugativa y su rango de hospedador aumentan considerablemente. Otra manera de ampliar el rango de hospedador se ha observado cuando, durante la coevolución, el plásmido adquiere por transferencia lateral un cassette toxina-antitoxina (Loftie-Eaton *et al.*, 2016).

La pérdida de eficiencia conjugativa puede parecer un resultado esperable en la coevolución plásmido-hospedador, dado el coste metabólico que supone la conjugación (Bentley *et al.*, 1990; Haft, Mittler and Traxler, 2009; San Millan and MacLean, 2017), sin embargo, lo que nos indican estos resultados es que la adaptación del plásmido depende (como con los sistemas de inhibición de la respuesta SOS, (Golub, Bailone and Devoret, 1988) del número de hospedadores potenciales: si hay varias especies en el medio (que es lo habitual en cualquier medio natural), aunque no sean estables en ninguno de ellas y no haya selección positiva, algunos plásmidos

pueden sobrevivir “saltando” de un hospedador a otro (Bergstrom, Lipsitch and Levin, 2000; De Gelder *et al.*, 2007; Heuer, Fox and Top, 2007; Hall *et al.*, 2016), y se estimularán los determinantes de promiscuidad: genes de conjugación, sistemas de rango amplio de hospedador, etc.

La promoción de la transferencia de información en una población heterogénea promueve la “cooperación” entre individuos del sistema (Dimitriu *et al.*, 2014), dando lugar a la formación de “parches” o subpoblaciones que contienen genes “sociales”, lo que evita que toda la población cargue con el peso de portar estos genes (Koraimann and Wagner, 2014) hasta el momento en que sean necesarios (como la aparición de antibióticos, metales pesados, fagos...). Esto además favorece la competición entre las subpoblaciones, estimulando a su vez el mantenimiento de estos caracteres. La formación de estas subpoblaciones o “parches” se han observado extensamente en la formación de transconjugantes sobre superficies sólidas y en biofilms (Christensen *et al.*, 1998; Fox *et al.*, 2008; Król *et al.*, 2013; Stalder and Top, 2016b). Por otro lado,

1.11. Computación biológica

La computación es la acción de realizar cálculos matemáticos (aritméticos o no aritméticos). Así, realizan computación biológica todos los dispositivos naturales o artificiales que, empleando moléculas propias de la vida como los ácidos nucleicos o las proteínas, son capaces de recibir una entrada, realizar un cálculo (lógico o aritmético) y producir una respuesta de forma reproducible. El campo de la computación biológica surgió de la capacidad de la biología sintética para diseñar y construir sistemas biológicos que fuesen capaces de realizar esa función.

Los primeros trabajos teóricos que sentaron las bases de la computación biológica datan de mediados de los 90 (Adleman, 1994; Lipton, 1995) y trataban de resolver varios problemas de tipo NP-completo: el problema de satisfacibilidad booleano (Cook, 1971) y el problema de la ruta Hamiltoniana (Garey and Johnson, 1979), cuyas soluciones eran imposibles de alcanzar en tiempos razonables empleando computadores electrónicos clásicos, pero no así empleando computación distribuida (Rozen, McGrew and Ellington, 1996).

Estos trabajos planteaban la posibilidad de crear una versión de la “máquina de Turing universal” empleando una cadena de ADN como cinta de símbolos y otra como cinta de estados. Ciertas reacciones enzimáticas serían las órdenes (Rozen, McGrew and Ellington, 1996). Algo después (y de forma casi simultánea) aparecieron varios trabajos que trataban de pasar de la teoría a la práctica: 1) El primero de ellos empleaba secuencias de ADN adheridas a una superficie y la computación consistía en la hibridación de otras secuencias complementarias y la digestión del ADN no hibridado por una exonucleasa (Smith 1998); 2) otro empleaba plásmidos y digestión con enzimas de restricción (Head 2000); 3) un tercero empleaba ADN de hebra sencilla y su capacidad para formar estructuras secundarias del ADN llamadas “horquillas” (Sakamoto 2000); 4) el último empleaba ARN y digestión por RNasa H (Faulhammer 2000). La ventaja de estos sistemas, aunque secuencialmente más lentos que un computador electrónico clásico, era que podían ser paralelizados de forma muy sencilla y a niveles impensables para los sistemas basados en transistores.

Ese mismo año aparecieron varios trabajos teóricos que abrirían paso a dos grandes campos de la computación biológica: el artículo teórico sobre computación usando membranas (o sistemas P, (Păun and Rozenberg, 2002), y los artículos del “Repressilator” (Elowitz, Michael B.; Leibler, 2000) y del “interruptor” (Gardner, Cantor and Collins, 2000) que empleaban la acción concertada de 3 y 2 reguladores transcripcionales respectivamente que regulaban la síntesis unos de otros y de unos genes reporteros en un circuito genético sintético, empleando *E.coli* como chasis biológico.

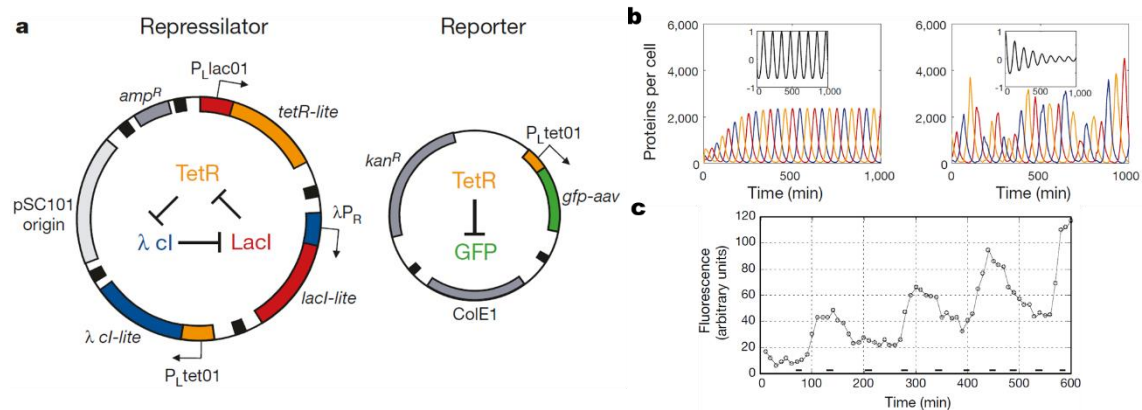


Figura 10. Esquema básico del funcionamiento del “repressilator” (tomado de Elowitz 2000). A) Un plásmido contiene el circuito transcripcional, que consiste en tres represores transcripcionales (*TetR*, *LacI* y *ci*) que reprimen la expresión cada uno del siguiente, produciendo oscilaciones en la concentración de cada uno de ellos. Otro plásmido contiene el gen *gfp*, bajo el control de *TetR*: cuando la concentración del represor se eleva la producción de la proteína fluorescente se detiene y la fluorescencia va decayendo según se diluye la proteína durante las divisiones celulares. B) Predicción con un modelo determinista (izquierda) y con un modelo estocástico (dcha.) de las concentraciones de los 3 represores *ci* (azul), *TetR* (naranja) y *LacI* (rojo). C) Medidas de fluorescencia de una célula portando ambos plásmidos a lo largo de 10 horas (600 minutos).

Este método de emplear circuitos transcripcionales y genes reporteros fluorescentes prometía grandes posibilidades: el acoplamiento entre el producto de uno con la entrada de otro distinto, ortogonal, permitiría la escalabilidad del sistema y la construcción de puertas lógicas (y así realizar cálculos booleanos como un ordenador clásico, Buchler 2003) y así se demostró empíricamente (Guet 2002) (ver Figura 11). Sin embargo, en un trabajo teórico (Shen-Orr 2002) observó que, por algún motivo, la naturaleza casi nunca emplea más de tres capas de computación, quizás debido al ruido asociado a la detección y a la producción de señal en estos sistemas (Blake 2003).

Un tiempo después, un trabajo teórico (Brenner 2008) y otro práctico (Balagaddé 2008) demostraban que la construcción de circuitos genéticos alojados en un solo hospedador no sería capaz de avanzar en complejidad más allá de la combinación de dos o tres puertas lógicas (alcanzado por Seon Moon 2012 usando combinaciones de chaperonas y factores de transcripción) debido a varios factores: dificultad de introducir grandes circuitos heterólogos sintéticos y conseguir que se replicasen y expresasen de forma estable en el tiempo, evitando además interacciones cruzadas con la red de regulación del hospedador y provocando una carga metabólica exagerada (Wu 2016, McCarty 2019). Una solución para estos problemas era el empleo de consorcios de células, con funciones distribuidas entre sí, ahora el problema era encontrar un sistema de comunicación de señal válido entre células (Hennig 2015).

El sistema de comunicación intercelular que se implantó fue el de las feromonas sexuales (en diseños basados en hongos y levaduras, Hennig 2015), o bien el sistema natural de “Quorum Sensing” de bacterias (Williams 2007) como mensajeros solubles. Aunque se continuaron

realizando trabajos basado en redes transcripcionales gracias al empleo de consorcios celulares y sistemas artificiales de “quorum sensing” (Chen 2015, Scott 2016), pronto se demostró que este sistema planteaba demasiados problemas de escalabilidad (Maciá 2014).

Por todo ello se planteó la posibilidad de realizar computación biológica empleando un consorcio altamente distribuido de células de *E.coli*, en el que la computación era binaria y basada en la naturaleza modular de los relaxosomas y con un sistema de comunicación ortogonal basado en la conjugación de plásmidos.

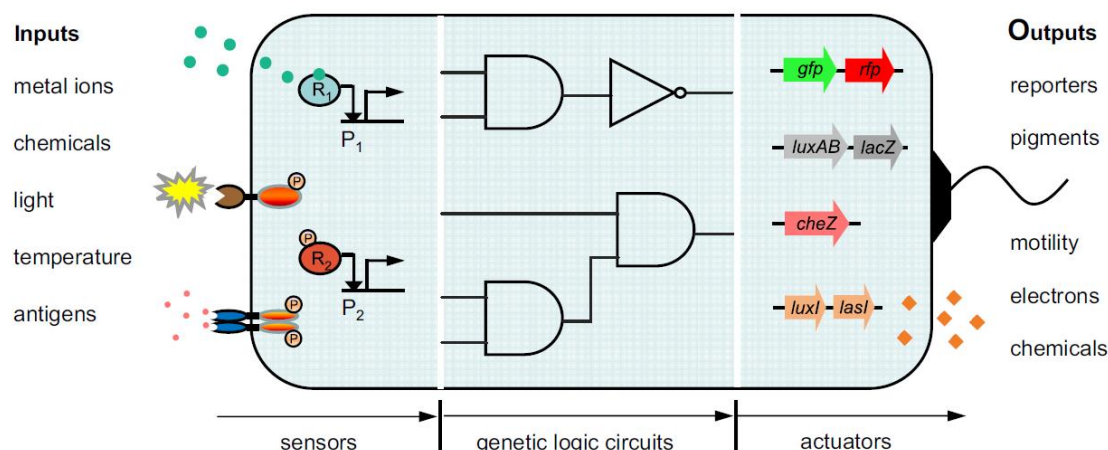


Figura 11. Esquema general de un biosensor celular sintético. Estos sistemas comprenden varios módulos intercambiables e interconectados: 1) los sensores de señal, que activan 2) el circuito genético de procesamiento de la información y 3) las proteínas actuadoras, producto de la computación por el circuito genético (aunque también puede activar su degradación), que generan a su vez una señal que informa de que se ha llevado a cabo la computación (y, en su caso, activan al siguiente biosensor). El circuito genético suele estar compuesto por piezas aisladas de diversos circuitos de regulación genéticos, preferiblemente de otros organismos para evitar interferencias entre el Sistema artificial y la célula en la que está montado (o chasis biológico). (Tomado de Wang 2013)

1.12. PLASWIRES

1.12.1. Concepto

El proyecto Plaswires consiste en construir un sistema computador que emplea como sistema de transmisión de la información la conjugación. La información transmitida está codificada en forma de ADN y el soporte físico de la información son plásmidos: moléculas de ADN circulares de longitud variable. El sistema de comunicación conocido como conjugación emplea un total de 11 componentes para establecer el canal (de aquí en adelante “wire”) entre un emisor (donador o “D”) y un receptor (o “R”) y otros 3 componentes más para disparar la comunicación. Todos los componentes son proteínas que están codificadas en forma de ADN en plásmidos movilizables y cromosomas (no movilizables). La computación es llevada a cabo en compartimentos cerrados, que son las células, y el cálculo realizado es **binario**: están todos los componentes necesarios para movilizar/no están todos los componentes.

A nivel experimental, se establece la mezcla de células conteniendo los distintos plásmidos sobre superficies de LB agar. Para poder detener por completo el sistema de manera sencilla se usan derivados de plásmidos cuyos *pilus* son ineficientes en líquido como los IncP, IncN e IncW, cuya eficiencia en la transmisión disminuye a una milésima parte cuando se suspende la mezcla en una disolución acuosa.

1.12.2. Propiedades del sistema

La propiedad más importante de este mecanismo de transmisión de la información es que es **modular**: para que suceda la conjugación es necesario que estén presentes en la misma célula - y activos- los 14 componentes implicados, pero no necesariamente tienen que ser aportados por el plásmido transmitido. Dicho plásmido sólo tiene que portar una secuencia identificativa: el *oriT*. Aparte de esta secuencia puede transportar teóricamente tanta información como deseemos desde D hasta R a través del cable o “wire”.

Los 11 componentes necesarios para construir el canal están codificados en el cromosoma de las células D y R. Los tres componentes restantes están codificados en plásmidos movilizables, en varias combinaciones. Estos plásmidos también tienen secuencias que codifican para componentes de otras conjugaciones (de aquí en adelante el “carga”, ver figura I12).

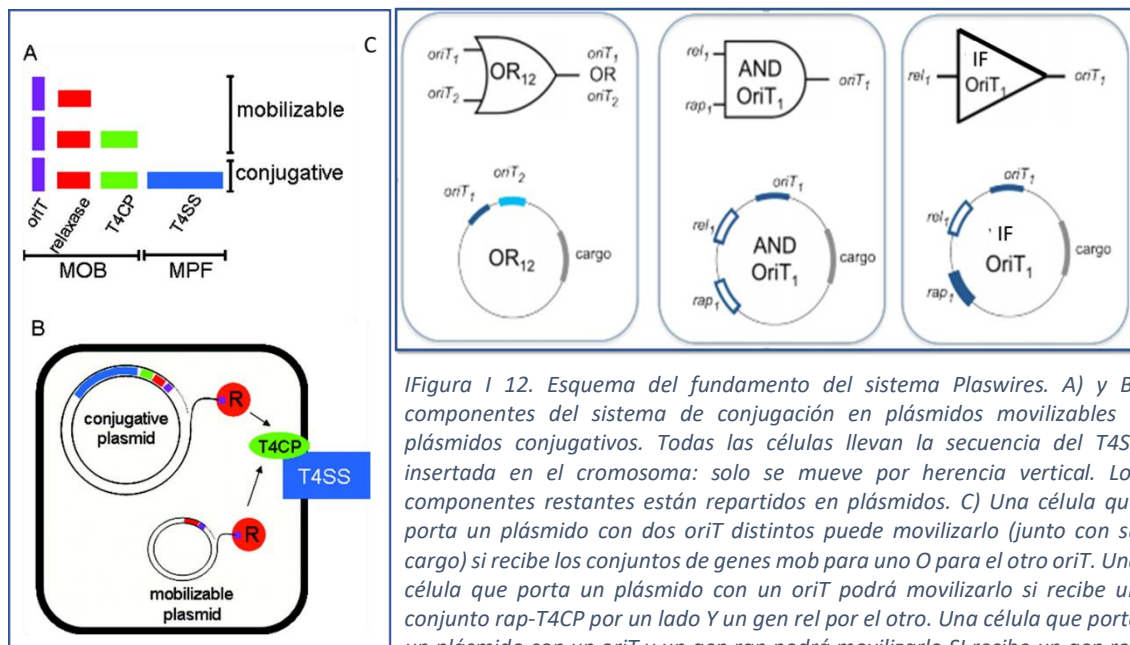


Figura I 12. Esquema del fundamento del sistema Plasmidwire. A) y B) componentes del sistema de conjugación en plásmidos movilizables y plásmidos conjugativos. Todas las células llevan la secuencia del T4SS insertada en el cromosoma: solo se mueve por herencia vertical. Los componentes restantes están repartidos en plásmidos. C) Una célula que porta un plásmido con dos *oriT* distintos puede movilizarlo (junto con su carga) si recibe los conjuntos de genes *mob* para uno O para el otro *oriT*. Una célula que porta un plásmido con un *oriT* podrá movilizarlo si recibe un conjunto *rap*-*T4CP* por un lado Y un gen *rel* por el otro. Una célula que porta un plásmido con un *oriT* y un gen *rap* podrá movilizarlo SI recibe un gen *rel*. (Tomado de Smillie et al., 2010).

Otra propiedad fundamental para el funcionamiento de este sistema es que los sistemas conjugativos son **ortogonales** entre sí: los 14 componentes sólo se reconocen entre sí. Esto permite que en una célula coexistan moléculas de ADN que codifican componentes para varios sistemas conjugativos sin provocar interferencias. Cada sistema solo moviliza los plásmidos con una secuencia *oriT* específica a través de su propio cable.

Este sistema es **direccional**: los sistemas de exclusión de entrada codificados por cada sistema conjugativo dirigen la movilización de plásmidos hacia cepas que no codifican el mismo sistema conjugativo.

Todas estas propiedades hacen al sistema **escalable**: se pueden apilar varias capas de transmisión-computación-transmisión siempre y cuando haya suficientes sistemas conjugativos ortogonales distintos, suficiente intensidad de señal, la proporción señal/ruido se mantenga suficientemente alta y las células se mantengan capaces de computar. Esto ha permitido, finalmente la construcción de circuitos SOP y POS (ver figura I 13) y el diseño de un array programable (PLA).

1.12.3. Componentes del sistema

Dado que, de los 3 componentes incorporados en plásmidos movilizables, la proteína acopladora viola en ocasiones la regla de ortogonalidad descrita para el resto de los componentes de la conjugación, la computación se hará con plásmidos movilizables cuyo cargo sea la proteína acopladora y alguno de los otros dos componentes: la proteína accesoria (Rap) y la relaxasa (Rel). Además, cada plásmido porta un origen de replicación y un origen de transferencia, así como un marcador de resistencia a antibiótico para poder determinar las eficiencias de transmisión intermedias (ver figura I13).

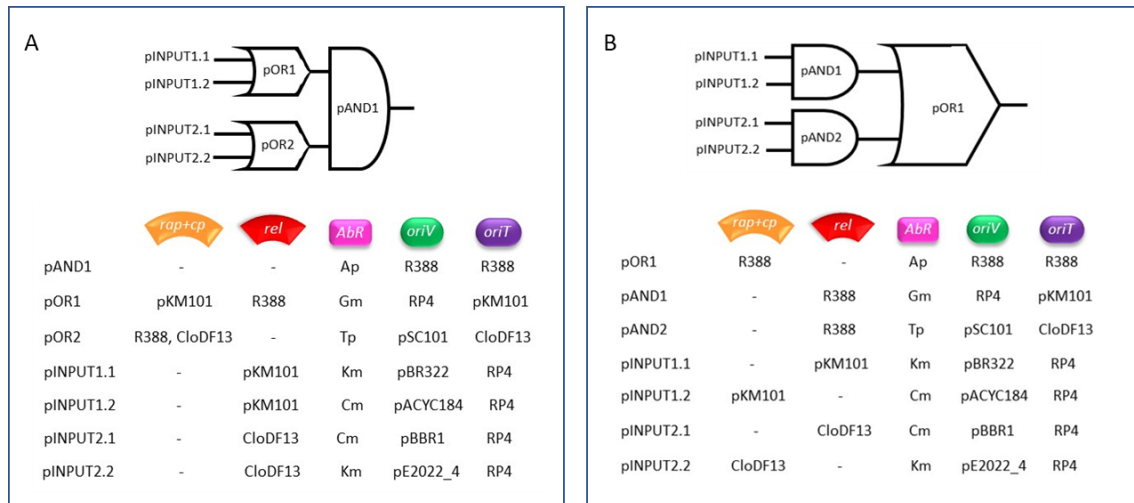


Figura I 13. Representación esquemática de los circuitos POS (izquierda) y SOP (derecha). Cada puerta lógica es una célula que contiene el plásmido indicado dentro, y necesita recibir los plásmidos que provienen de su izquierda para movilizarlo. Todos los plásmidos son construcciones de 3- 5 módulos que comprenden: un origen de transferencia (morado), un origen de replicación (verde), un marcador de resistencia a antibiótico (rosa), una relaxasa (rojo) y un conjunto proteína accesoria + proteína acopladora (naranja).

Los ensayos de puesta a punto realizados en el presente trabajo se realizaron con un plásmido movilizable con origen de replicación RK2 (bajo número de copias), marcador de resistencia a ampicilina, origen de transferencia de R388, y como cargo las proteínas rap, rel y T4CP de R388, de tal manera que solo necesita los genes del T4SS de R388 para ser movilizado.

Las operaciones que puede computar una célula en este sistema dependen de los plásmidos que tuviera en un inicio:

-Si portaba un plásmido p0 al que sólo le falta un componente X para poder ser movilizado, la célula puede comportarse como A) un interruptor/transistor: si recibe un plásmido movilizado pA cuyo cargo sea la secuencia para expresar X, entonces movilizará el plásmido p0. B) como una puerta lógica OR: si existen dos o más plásmidos pA, pB... en el sistema cuyo cargo es la secuencia para expresar X la célula puede movilizar su plásmido p0 al recibir pA o pB o...

-Si portaba un plásmido p0 al que le faltaban dos componentes X e Y para poder ser movilizado, la célula puede comportarse como una puerta lógica AND: suponiendo que en el sistema existe un plásmido pX que porta como cargo la secuencia para expresar X y un plásmido pY que puede expresar Y, el plásmido p0 será movilizado sólo cuando la célula reciba los plásmidos pX y pY.

En la bibliografía ya existen numerosos ejemplos de computación usando organismos vivos, y sólo uno emplea la conjugación como sistema de transmisión de información (Wang 2018), aunque la computación en dicho trabajo es realizada por la acción del sistema CRISPR-Cas. Como hemos visto antes, los sistemas de computación que emplean como sistema de transmisión de información la difusión de moléculas sencillas presenta varios problemas que tratamos de resolver con nuestro sistema Plaswires:

1. Una vez secretada la señal difusible no existe control sobre ella y, al expandirse por difusión, carece de direccionalidad y su concentración en el medio no es constante (sigue aproximadamente la ley de Fick), la computación sucede -o no- en función de la posición de la célula computadora. Nuestro sistema en cambio es direccional y la transmisión se da por contacto D-R a través del cable
2. No se conocen más de 10 parejas molécula-receptor e incluso menos que sean completamente ortogonales y no generen interferencias con otros sistemas, por lo que el sistema no es muy escalable. La cantidad de plásmidos conjugativos conocidos en enterobacterias supera hace tiempo la centena (Smillie *et al.*, 2010), aunque si situamos el límite en los grupos de plásmidos que pueden habitar establemente dentro del mismo hospedador (aunque esta condición no es necesaria para que suceda la computación), se conocen unos 20 grupos de incompatibilidad.
3. La síntesis de moléculas señalizadoras no se puede modular para ajustarse tan finamente a los umbrales de detección/no detección de los receptores que pueda producir una respuesta todo o nada reproducible. En nuestro sistema el receptor solo necesita recibir un plásmido con el cargamento necesario, que es la cantidad de plásmidos que se espera que envíe un donador competente.
4. Tanto la señal de entrada como la de salida no son discretas y de lógica binaria (hay señal/no hay señal) sino que se comportan casi como un sistema continuo (aunque se trata de moléculas discretas, la cantidad de moléculas señal producidas es tan grande que se puede aproximar a variaciones continuas en la concentración). Con el sistema Plaswires la lógica sí es binaria, o no hay plásmido expresando la maquinaria necesaria o sí lo hay, sin estados intermedios.
5. La síntesis de moléculas señal, la recepción y la eliminación de estas del medio son sistemas extremadamente imprecisos, lo que lleva a una relación muy baja de señal/ruido (Blake *et al.*, 2003; Ruiz, de la Cruz and Fernandez-Lopez, 2018). Este problema también aparece en Plaswires. Frecuencias de conjugación por debajo de 1 T/D producen una progresiva pérdida de la señal en cada paso de computación (ver Figura I 14). Al comienzo de esta tesis, no se conocía si esta frecuencia de conjugación se debía al método experimental empleado, al modo de dispersión de los plásmidos o si era subsanable de alguna manera. Abordar este problema, fue el objetivo global de esta tesis.

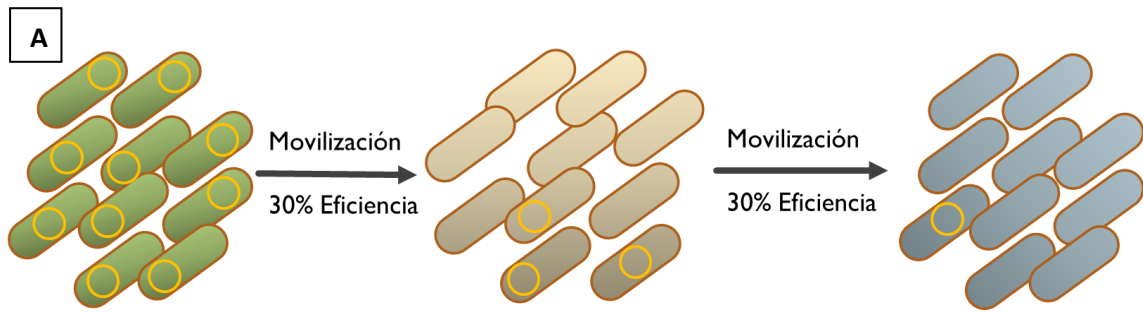
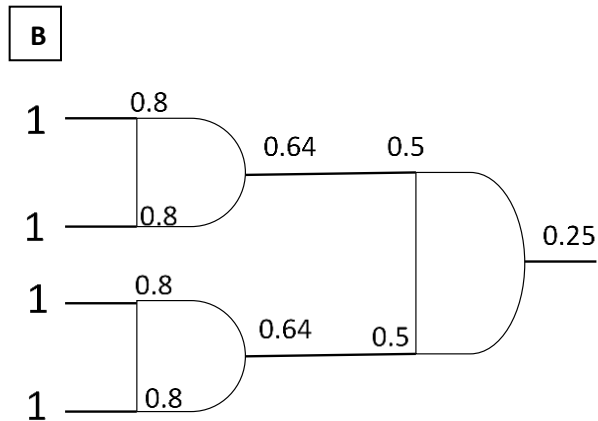


Figura I 14. Pérdida de señal tras varios pasos sucesivos de movilización. A) Se representa el montaje más sencillo de Plaswires que se puede diseñar con tres capas y dos pasos de conjugación, en el que sólo es necesario recibir un plásmido de la capa anterior para cumplir la condición de disparo hacia la siguiente capa. En este caso hipotético, si solo un 30% de los donadores de la primera capa (en verde) fueran competentes para conjuguar (eficiencia de movilización de 0,3 T/D), tras dos pasos, sólo un 9% de los plásmidos llegarían a la población receptora (en azul). Esto implicaría una pérdida del 91% en la señal, lo que hace al sistema muy ineficiente. B) En un caso más complejo, pero con un sistema mucho más eficiente, en el que cada célula (semicírculos) tuviese que recibir dos plásmidos (líneas horizontales) para movilizar su plásmido, pero éstos tuvieran una eficiencia del 80% (0.8 T/D), el resultado tras dos pasos de conjugación sería de una pérdida de señal total del 75%.



Materiales y Métodos

2. Materiales y métodos

2.1. Materiales

2.1.1 Cepas de *Escherichia coli*.

Todas las cepas utilizadas en este trabajo pertenecen a la especie *Escherichia coli*

Tabla M2. Cepas de *Escherichia coli* empleadas en este trabajo

Cepa	Genotipo	Referencia
DH5α	F ⁻ endA1 hsdR17 (rk ⁻ , mk ⁺) supE44 thi-1 λ ⁻ recA1 gyrA96 relA1 deoRΔ(lacZYA-argF)-U169 φ80d lacZΔM15	(Grant <i>et al.</i> , 2006)
Bw27783	lacI ^q rrnB _{T14} lacZ _{WJ16} hsdR514 Δ(araBAD _{AH33}) Δ(rhaBAD _{LD78}) Δ(araFGH) φ(ΔaraEp P _{CP8} -araE)	(Khlebnikov <i>et al.</i> , 2000, 2001)
MG1655	Dam ⁺ , F ⁻ , lambda ⁻ , rph-1	(Blattner <i>et al.</i> , 1997)
MDS42	MG1655Δ(fhuACDB) endA ⁻ , Δ(699 genes, secuencias de inserción y profagos)	(Pósfai <i>et al.</i> , 2006)
MFDpir	MG1655::RP4 (oriTΔnic35, ΔaphA), ΔrecA, dapA::pir-erm ^R .	(Ferrières <i>et al.</i> , 2010)
N-wire	MG1655::mpf_R46	Este trabajo
W-wire	MDS42::mpf_R388	Garcillán-Barcia (no publicado)
W-wireΔeex	MDS42::mpf_R388(Δeex)	Garcillán-Barcia (no publicado)
DH5α pir⁺	endA1 hsdR17 glnV44(=supE44) thi-1 recA1 gyrA96 relA1 φ80dlacΔ(lacZ)M15 Δ(lacZYA-argF)U169 zdg-232::Tn10 uidA::pir ⁺	(Platt <i>et al.</i> , 2000)

2.1.2. Cultivos bacterianos

Las cepas arriba descritas fueron cultivadas en medio líquido a 37°C con agitación (120 revoluciones por minuto). El medio de cultivo comúnmente empleado fue LB (Lysogenic Broth, (10 g de triptona, 5 g de extracto de levadura, 5 g de NaCl por litro, SigmaAldrich). Para cultivo en sólido se emplearon placas de Petri (90x14mm) con LB-agar (LB + 35 g de agar por litro de LB, Sigma).

Para reducir en lo posible la autofluorescencia del LB, los experimentos de citometría de flujo y microscopía de fluorescencia se realizaron cultivando las cepas en sales M9 (6 g de Na₂HPO₄, 3g de KH₂PO₄, 1g de NH₄Cl y 0,5g de NaCl por litro, suplementado con CaCl₂ (100 μM), MgSO₄ (20 mM), SigmaAldrich) con un 10% de medio LB como fuente de carbono.

Para mantener las células vivas a corto plazo pero sin crecimiento se empleó una disolución tampón PBS isoosmótica a pH 7.4 (8 g/l NaCl, 0,2 g/l KCl, 1,44 g/l Na₂HPO₄, 0.24 g/l KH₂PO₄).

Para guardar las cepas a medio y largo plazo (a -20°C y -80°C) se centrifugaron 10 ml de cultivo saturado y se resuspendió el pellet en 1 ml de una mezcla de agua y glicerol al 50% y peptona (0,15 g/l).

2.1.3. Antibióticos e inductores de la expresión genética

Las cepas se seleccionaron, tanto en medio líquido como en medio sólido, usando los siguientes antibióticos (Apollo), preparados en stocks de concentración 1000x:

Tabla 3. Antibióticos empleados

Antibiótico	Disolvente	Concentración final
Ácido Nalidíxico	Agua	20 µg/ml
Rifampicina	DMSO	50 µg/ml
Trimetoprim	DMSO	10 µg/ml
Cloranfenicol	Etanol	25 µg/ml
Ampicilina	Agua	100 µg/ml
Carbenicilina	Agua	100 µg/ml
Kanamicina	Agua	50 µg/ml
Gentamicina	Agua	10 µg/ml

Para los experimentos en los que se requirió un control de la actividad transcripcional se emplearon los siguientes inductores:

Tabla 4. Moléculas reguladoras de la expresión

Mol.reguladora	Nombre comercial	Función	Concentración final
Arabinosa	L-(+)-arabinosa, Sigma	Inducción del promotor P_{ara}	50µM
Glucosa		Represión del promotor P_{ara}	5 g/l
aTc	Hidrocloruro de anhidrotetraciclina, Sigma	Inducción del promotor P_A	100 µg/l
IPTG(*)	Isopropil-tiogalactósido, *	Inducción del promotor P_{lac}	100 µM

2.1.4. Plásmidos

Se emplearon los siguientes plásmidos, algunos naturales y otros ya construidos en anteriores trabajos:

Tabla 5. Plásmidos empleados descritos anteriormente

Nombre	Resistencias	Descripción	Referencia
pRL334	Ap	RP4ΔaphA (Kn^S), IncP1α, conjugativo	(Elhai <i>et al.</i> , 1997)
R388	Tp	IncW conjugativo	(Datta and Hedges, 1972)
pKM101	Ap	Deleción de 15 kb de R46, IncN, conjugativo	(Langer, et al., 1981)
R1drd19	Ap, Km, Tc	Versión des-reprimida de R1, IncF, conjugativo	(Meynell and Datta, 1967)

Nombre	Resistencias	Descripción	Referencia
pOX38	Cm	Deleción de x kb de F, IncF, conjugativo	(Chandler and Galas, 1983)
R751	Tp	IncP1 β , conjugativo	(Meyer and Shapiro, 1980)
R64	Tc, Sm	IncI1, conjugativo	(Sampei <i>et al.</i> , 2010)
R7K	Ap	IncW, conjugativo	(Coetzee <i>et al.</i> , 1972)
pMBUI4	Tc	IncW, conjugativo	(Brown <i>et al.</i> , 2013)
pIE522	Km, Gm	IncW, conjugativo	(Götz <i>et al.</i> , 1996)
pIE321	Tc	IncW, conjugativo	
pSa	Km, Cm, Sm	IncW, conjugativo	(Watanabe, <i>et al.</i> , 1968)
pSU2007	Km	R388 Δ dhfR::aphA	(Martinez and de la Cruz, 1988)
pAR12	Cm	pBAD33::trwA	(del Campo, 2016)
pAR13	Cm	pBAD33::korA	
pIC9	Tp, Km	R388 Δ orf14	
pIC12	Tp, Km	R388 Δ (kfrA-osa)	
pSU1027	Tp	R388 replicón p15a	(Mötsch <i>et al.</i> , 1985)
R388 Δ eex	Tp		(Bolland <i>et al.</i> , 1990)
pSU5024	Ap	pET3a::eex_R388	(Fernandez-Lopez <i>et al.</i> , 2005)
pSU4280	Cm	pSU19::Mob_pKM101	(Llosa, <i>et al.</i> , 2003)
pSU4280evo	Cm	pSU4280 con una mutación puntual que le permite ser movilizado eficientemente por el mpf_R388.	Donado por Garcillán-Barcia (n.p.)
pMTX662	Ap	pKM101 Δ mob	(Draper <i>et al.</i> , 2005)
pAR119	Ap, Kn, Tc	R1drd19::YFP	(Reisner <i>et al.</i> , 2002)
pSEVA121::mobW	Ap	oriV_RK2, oriT_RP4, oriT-TrwABC_R388, movilizable por R388y RP4.	Donado por Garcillán-Barcia (n.p.)

2.1.5. Vectores de clonación

Los siguientes plásmidos, se emplearon para 1) el clonaje orientado a la expresión modulable de genes y operones asociados a la conjugación bacteriana (derivados de pBAD33), 2) para la integración de genes y operones en el cromosoma (derivados de pOSIP) y 3) para el clonaje de la librería de RNAs guía empleados por dCas9:

Tabla 6. Plásmidos empleados como vectores de clonación

Nombre	Resistencias	Descripción	Referencia
pBAD33	Cm	OriV-p15A, araC, P _{ara}	(Guzman <i>et al.</i> , 1995)
pOSIP	Km	OriV-R6Ky, se integra en el locus cromosómico del gen <i>attB</i> del fago 186	(St-Pierre <i>et al.</i> , 2013)
pE-FLP		Replicón termosensible, elimina el cassette Km ^R (insertado por pOSIP) del cromosoma.	

2.1.6. Plásmidos construidos en esta tesis

Los siguientes plásmidos se construyeron amplificando por PCR fragmentos de otros plásmidos (arriba descritos) y fueron insertados mediante ensamblaje Gibson en los vectores descritos en la Tabla 6. Plásmidos empleados como vectores de clonación La correcta inserción de los mismos se comprobó mediante PCR y secuenciación.

Tabla 7. Plásmidos construidos en este trabajo

Nombre	Resist	Descripción
pBAD33::TrwB	Cm	Sobreexpresión gen <i>trwB</i>
pBAD33::TrwC	Cm	Sobreexpresión gen <i>trwC</i>
pBAD33::TrwABC	Cm	Sobreexpresión operón mob_R388
pBAD33::TrwD	Cm	Sobreexpresión gen <i>trwD</i>
pBAD33::TrwE	Cm	Sobreexpresión gen <i>trwE</i>
pBAD33::TrwF	Cm	Sobreexpresión gen <i>trwF</i>
pBAD33::TrwHG	Cm	Sobreexpresión genes <i>trwHG</i>
pBAD33::TrwHGFED	Cm	2º Operón mpf_R388
pBAD33::TrwI	Cm	Sobreexpresión gen <i>trwI</i>
pBAD33::TrwJ	Cm	Sobreexpresión gen <i>trwJ</i>
pBAD33::TrwK	Cm	Sobreexpresión gen <i>trwK</i>
pBAD33::TrwM	Cm	Sobreexpresión gen <i>trwM</i>
pBAD33::TrwN	Cm	Sobreexpresión gen <i>trwN</i>
pBAD33::KorA_pKM101	Cm	Sobreexpresión gen <i>korA</i> de pKM101
pBAD33::KorA-TrwLMKJI	Cm	1º Operón mpf_R388
pBAD33::TrwMKJI	Cm	Mismo operón, sin represor <i>korA</i> ni <i>pilA</i> .
pBAD33::stbB	Cm	Sobreexpresión gen <i>stbB</i>
pBAD33::TrwJ _{mut1}	Cm	Sobreexpresión gen <i>trwB</i>
pBAD33::TrwJ _{mut2}	Cm	Sobreexpresión gen <i>trwB</i>
pBAD33::TrwJ _{mut3}	Cm	Mutación en V140W de TrwJ
pBAD33::TraC	Cm	Adhesina de pKM101
pBAD33::TraC _{mut}	Cm	Mutación en V144W de TraC
pBAD33::TraST	Cm	Genes de exclusión de entrada de R1
pOSIP::mpf_pKM101	Km	Genes <i>korB</i> -TraG (mpf) de pKM101.
pOSIP::dhfr	Km, Tp	Contiene el gen de resistencia a trimetoprim
pOSIP::cat	Km, Cm	Contiene el gen de resistencia a cloranfenicol
pOSIP::gat	Km, Gm	Contiene el gen de resistencia a gentamicina

2.1.7. Oligonucleótidos

A continuación, se presenta una lista con los oligonucleótidos empleados para amplificación y secuenciación de ADN. Los oligonucleótidos empleados para amplificar moléculas de ADN que luego serían unidas por ensamblaje Gibson aparecen en dos formatos: en letra redonda la región 3' que se une al ADN molde para amplificarlo durante la PCR y en negrita la región 5' de homología con las otras moléculas con las que se ensamblará el fragmento en pasos posteriores. En los oligonucleótidos empleados para mutagénesis dirigida se señalan en rojo las bases que se mutaron para dar lugar al cambio de aminoácido deseado. Los oligonucleótidos de 60 pares de bases o menos se distribuían desalados, los de mayor longitud purificados por HPLC y los empleados para mutagénesis dirigida Quikchange® (Agilent) purificados por HPLC y fosforilados en el extremo 5'.

Nombre	Secuencia
Oligos para la construcción de clones de sobreexpresión de genes <i>tra</i>	
pBAD Isot FWD	GGGATCCTCTAGAGTCGACCTGC
pBAD Isot REV	AATTCGCTAGCCCAAAAAACGG
pBAD33::TrwBC FWD (oJRG16)	CCATACCCGTTTTTTTGGGCTAGCGAATTCGTTGAGGGGACTATCTAATGCATCCAGACG
pBAD33::TrwC FWD (oJRG22)	CCATACCCGTTTTTTTGGGCTAGCGAATTCGTTGAGGGGACTATCTAATGCTCAGTC
pBAD33::TrwC REV	GCATGCCTGCAGGTCGACTCTAGAGGATCCCCGGGTCGCTACGGGCTT TTTCTTGTCCTC
pBAD33::TrwC REV 2	GCATGCCTGCAGGTCGACTCTAGAGGATCCCCGGGTCCTTACCTTCCGGCCTCC
pBAD33::TrwD FWD	CTCCATACCCGTTTTTTTGGGCTAGCGAATTCGAGCATCTGGATTTCAGCGATGTCTACA
pBAD33::TrwE FWD	CTCCATACCCGTTTTTTTGGGCTAGCGAATTCGAGCAAGGAGGCAACTAATGTTCCGGTCG
pBAD33::TrwE REV	GCATGCCTGCAGGTCGACTCTAGAGGATCCCCGGGTATCTTTCCCGACGCGTTCCCGC
pBAD33::TrwF FWD	CTCCATACCCGTTTTTTTGGGCTAGCGAATTCGAGCTGAGGGGGGCACCATGAAGAAAC
pBAD33::TrwF REV	GCATGCCTGCAGGTCGACTCTAGAGGATCCCCGGGTCTTTCGACCGAACATTAGTTGCC
pBAD33::TrwG FWD	CTCCATACCCGTTTTTTTGGGCTAGCGAATTCGAGCAGCGAGGGGCACTATGAGCAAG
pBAD33::TrwG REV	GCATGCCTGCAGGTCGACTCTAGAGGATCCCCGGGTTCTTCATGGTGCCCCCTCAG
pBAD33::TrwH REV	GCATGCCTGCAGGTCGACTCTAGAGGATCCCCGGGTTTCATAGTCCCCCTCGCTGAATT
pBAD33::TrwI FWD	CTGTTTCTCCATACCCGTTTTTTTGGGCTAGCGAATTCGGAGGAAATTGCCGTGGCCTTCG
pBAD33::TrwJ FWD	CTCCATACCCGTTTTTTTGGGCTAGCGAATTCGACGAAAGGAGCGACGTATGAAGAAGC
pBAD33::TrwJ REV	CATGCCTGCAGGTCGACTCTAGAGGATCCCCGGGTCATTGGATAGTCGGCATTCTTTGG
pBAD33::TrwK FWD	CTGTTTCTCCATACCCGTTTTTTTGGGCTAGCGAATTCGAAAAAGGAGATAGGCATGGG
pBAD33::TrwK REV	GCATGCCTGCAGGTCGACTCTAGAGGATCCCCGGGTTTCATACGTCGCTCCTTTCCG
pBAD33::TrwL FWD	CTCCATACCCGTTTTTTTGGGCTAGCGAATTCGACGCGAAAGGGGCGTTACTCATGGCA
pBAD33::TrwL FWD 2	CTCCATACCCGTTTTTTTGGGCTAGCGAATTCGAAAGGGGCGTTACTCATGGC
pBAD33::TrwL REV	GCATGCCTGCAGGTCGACTCTAGAGGATCCCCGGGTCCTTTAGGTAACAGCATGGCCG
pBAD33::TrwM FWD	CTCCATACCCGTTTTTTTGGGCTAGCGAATTCGACCTAAAGGGGGACAGTCATGAAGCC
pBAD33::TrwM REV	CATGCCTGCAGGTCGACTCTAGAGGATCCCCGGGTCCTATCTCCTTTTTCCGGTAGTTAGC
pBAD33::TrwN FWD	CTCCATACCCGTTTTTTTGGGCTAGCGAATTCGAGGGTGCGGTACTGATATGGCACTGG
pBAD33::TrwN REV	GCATGCCTGCAGGTCGACTCTAGAGGATCCCCGGGTTTCATGAGAGAAGGCATCTGCAAGC
stbB FWD	CTGTTTCTCCATACCCGTTTTTTTGGGCTAGCGAATTCGA CATATTTTTTCCAAGCGGAG
stbB REV	GCTTGATGCCTGCAGGTCGACTCTAGAGGATCCCCGGGT TTACTTGAGATAGCGGCAT
pBAD33::trwHGFED FW	CTCCATACCCGTTTTTTTGGGCTAGCGAATTCGAGCAGGAGAGGTGTTGACGTGAAAACC

Nombre	Secuencia
pBAD33::trwHGFED REV	GCATGCCTGCAGGTCGACTCTAGAGGATCCCCGGGTGAGGGCGGCTAAGCCATCTTGG
korA-Trwl FWD	CTCCATACCCGTTTTTTTGGGCTAGCGAATTCGACAAGGGCCAACCAAAATGAGAGC
korA-Trwl REV	GCATGCCTGCAGGTCGACTCTAGAGGATCCCCGGGTGACAACTACCCTGCTTTGCG
pBAD33::TrwlL inver FWD	CTCCATACCCGTTTTTTTGGGCTAGCGAATTCGATGACAACTACCCTGCTTTGCG
pBAD33::TrwlL inver REV	GCATGCCTGCAGGTCGACTCTAGAGGATCCCCGGGAAAGGGGCGTTACTCATGGC
TrwJM FWD largo	CTGTTTCTCCATACCCGTTTTTTTGGGCTAGCGAATTCGAACCTAAAGGGGGACAGTC
TrwJM REV largo	AATCTTGTTGAAAAGCGGTGTGAACAGCTCGAAGGCCACTCATTGGATAGTCGGCATT
TrwID FWD corto	GTGGCCTTCGAGCTGTT
TrwID REV largo	GCTTGCATGCCTGCAGGTCGACTCTAGAGGATCCCCGGGTCTAAGCCATCTTGACTTGG
TraST FWD	CTCCATACCCGTTTTTTTGGGCTAGCGAATTCGAGCCTGTGTTGGGA GATGATAATGAG
TraST REV	GCATGCCTGCAGGTCGACTCTAGAGGATCCCCGGGTTTCAGAGAATATTTGCGATTG
pBAD33::TraC FWD	CTCCATACCCGTTTTTTTGGGCTAGCGAATTCGA CGAGGCAAACTCCATGAAAA
pBAD33::TraC REV	CATGCCTGCAGGTCGACTCTAGAGGATCCCCGGGTCTCAGTTAATTGAAGGTGACGC
pKM101_korA FWD	CTACTGTTTCTCCATACCCGTTTTTTTGGGCTAGCGAATT GCCTTTTAAACCAGACAGG
pKM101_korA FWD 2	CTACTGTTTCTCCATACCCGTTTTTTTGGGCTAGCGAATT ATGAGGTTATGAATGGAACG
pKM101_korA REV	GCTTGCATGCCTGCAGGTCGACTCTAGAGGATCCC TTA CTACTATCTTCTGTTGATTGC

Oligos para comprobación por secuenciación Sanger

oJRG6	GGGCTAGCGAATTCGAGCTC
oJRG15	TTATCAGACCGCTTCTGCGTTC
oJRG19	CGAATTCGCTAGCCCCAAAAAACG
pBAD FWD	GGATCCTCTAGAGTCGACCTGC
pBAD REV	GCTCGAATTCGCTAGCCCCAAAAA
pBAD::33TrwHD Test head	GAGCTGTTCTGCCTTGACCG
pBAD::33TrwD Test head	TTGTCCAAACCTCTCCAGGG
pBAD::33TrwD Test tail	ATCTTTCTGGCCGAGCTGCG
pBAD::33TrwE Test head	AACCCGACGACTTTAGAGCC
pBAD::33TrwE Test tail	TTTTCCAACACTGCGAACGG
pBAD::33TrwF Test head	TTCCGGGCAAAGGCATAGGC
pBAD::33TrwF Test tail	TCTGCCAATGCCGATTTGCC
pBAD::33TrwK Test head	CAGTGATTGTTCTAGCTCCC
pBAD::33TrwK Test tail	AAAGCAGGGCGACCAATCGG
pBAD::33korATrwl Test T	GCATTGCCAGCGGGTTAGCC
pBAD::33korATrwl Test H	GAAGAGAGTAGGTGACTGGC
oJRG3	AAGCGGCTCGCTACCTATC
oJRG4	TCTGAACGGCGGTAATCC
oJRG7	CTGAAAATCGCCGTCGAGCT
oJRG8	AGCTCGACGGCGATTTTCAG
oJRG9	ATGGCAAGCCACGGCAAAAG
oJRG10	CTTTTGCCGTGGCTTGCCAT
oJRG11	TACAGCAAGAACACAGGCAAAAC

Nombre	Secuencia
oJRG12	GCGGAACCTTGGCAATTGGC
oJRG13	AATGCCGCGTGATGCAGAGC
oJRG14	CACTGACGATGCGAGTTCCG
KorA left	GCTTTATCAACGCTTTGCTGT
KorA right	TTCTTACTCAACGGGGCAAA
TrwL left	CCGCTATTGCTCCAAAATC
TrwM left	ATCGTTGGAAGTCGCGTTG
TrwM	AAAATCGTTGGAAGTCGCGTT
TrwK Right	TTATTGCCGAAGTCGGAGAC
TrwJ Right	AGCAGAACAGGCGTTGATTT
eex left	TCCTTGGGTTGTCGAGATA
eex right	CAAGAACAATCCCGTGAAA
TrwG left	ACGAACTCGCCAATCAAATC
TrwG right	AGCGACGATTGGCTATACCT
TrwH left 2	GTTGAAATCACTCGGCTGCT
TrwD right	TTCAAAGATCGGAAGCTGGT
TrwB right	TCTGAACGGCGGTAATCC
oriT left	TGCTAGGATTGAACCACTACAG
TrwA	AAGCGGCTCGCTACCTATC
trwK ini	TATCATATGGGGGCAATTGAATCCC
TrwK fin	TTTCGATCCTCATACGTCGCTCCTTC
TrwK inicio	GCAATTGAATCCCGCAAGC
TrwK medio	AGGAAGAAGAAGATGCGACC
TrwE left	GCGTCGATTACGTCTCCTTT
TrwJ left(bueno)	TGCGGCTACGTTCCCTCG
TrwJ left(malo)	CGAGGAACGTAGCCGCACG
TrwK5'	CAGCGGCACCAAAAGAACC
TrwK3'	GAGCAGGCGCTTATCGGTC
oriT start	TGCTGCACGATAACCCAATGCG
pBAD seq	CGTCACACTTTGCTATGCCA
pBAD largo (bueno)	CTGCCTTAAAAAATTACGCC
pBAD largo 2	GGGCGTAATTTTTTTAAGGC
pBAD corto	AGTTATTGGTGCCCTTAAACGC
seq2	CCGTTTTTTTGGGCTAGCG

Oligos para mutagénesis dirigidas

V144FWD	[Phos]TTACGACCGT TG GATGGCCGAA
V144REV	[Phos]GCACCTTTTTCCGCCAGCTTT
KAV	CGCTCTATCGAGGAACGTAGCCGCACGGCGGCGGCAACCGACA AAGGCCGTT GGCCTGCGGGCC
TrwJ_mut1	CGCTCTATCGAGGAACGTAGCCGCACGGCGGCGGCAACCGAC TGGGCCGTT GGCCTGCGGGCC
TrwJ_mut2	CGCTCTATCGAGGAACGTAGCCGCACGGCGGCGGCAACCGACA AAGTGGGTT GGCCTGCGGGCC
TrwJ_mut3	CGCTCTATCGAGGAACGTAGCCGCACGGCGGCGGCAACCGACA AAGGCC TGG GGCCTGCGGGCC

Nombre	Secuencia
TrwJ left 3	GTCGGTTGCCGCCGCCGT
pBAD largo 2	GGGCGTAATTTTTTAAGGC
pBAD largo 3	ATTCAGGCGTAGCACCAGGC

Oligos para clones pOSIP inserción en cromosoma

pLC143 FWD	CCTAACCTAACTGACAGGC
pLC143 REV	CTGATCAGTGAATTAATGGC
pCOR31 FWD	GGCCTTCTGCTTAATTTGATGCCTGTCAGTTAGGTTAGGTTGTACAGTCTATGCCTCG
pCOR31 REV	TATCGTGAGGATGCGTCATCGCCATTAATCACTGATCAGCAATTTACCGAACCACTCCG
Cloran FWD	GGCCTTCTGCTTAATTTGATGCCTGTCAG TTTAGGTTAGGAAGAGGTTCCAACCTTCA CC
Cloran REV	TATCGTGAGGATGCGTCATCGCCATTAAT TCACTGATCAGTAAGGGCACCAATAACTG CC
Trimet FWD	TATCGTGAGGATGCGTCATCGCCATTAAT TCACTGATCAGGCAGTCAGAGTTCGATTT GC
TrimetREV	GGCCTTCTGCTTAATTTGATGCCTGTCAG TTTAGGTTAGGCCTAACGATAAAGCTCAG CG
korB FWD	TATCGTGAGGATGCGTCATCGCCATTAAT TCACTGATCAGTTATCTTCAGATCATCA AGTGATAA
traB REV	AGGAAGTTCCATGAGTTTATCGG
traB FWD	CATATTATCGGAGACTGCCTGGC
traN REV	GGCGCTAATCAGAAGAACTCCC
traN FWD	ATAATTGGTACGTTCAACAACCGA
traG REV	GGCCTTCTGCTTAATTTGATGCCTGTCAG TTTAGGTTAGGTTACAGGCTCCCGTTCAC ACAC

Oligos empleados para comprobación y secuenciación

pLCtestTAIL	CTATTACTCAACAGGTAAGGCG
pLCtestHEAD	TAGAGACGAAAGTGATTGCG
TraG test tail	CATTAATGACGTGATCCTGCC
TraL test head	GTGTTGTAGCAGGAAAGCG

2.2 Métodos

2.2.1. Extracción de ADN

Los plásmidos empleados en esta tesis fueron extraídos de las cepas que los contenían mediante miniprep, empleando un kit comercial (GeneJET Plasmid Miniprep Kit - Thermo Fisher Scientific). Para ello se toma una colonia aislada de la cepa portadora del plásmido y se cultiva en medio LB líquido durante 18-24 horas a 37°C. Se centrifuga, se elimina el medio, se lisan las células y se aísla en columna el ADN superenrollado tras varios lavados. Finalmente, se eluye con un tampón comercial (Tris-HCl mM, pH 8.0) o con agua destilada.

2.2.2. PCR (reacción en cadena de la polimerasa)

La amplificación de ADN por reacción en cadena de la polimerasa se efectuó empleando tres protocolos distintos en función de su finalidad:

1. La polimerasa Phusion® (Thermo Scientific) para casos en los que se requiriese una especificidad y procesividad elevadas (clonación, mutagénesis dirigida). El protocolo seguido fue el recomendado por el fabricante: 98°C, 30" para desnaturalización inicial, 30-35 ciclos de: 98°C, 15" (desnaturalización), 60-72°C, 30" (hibridación cebador-molde), 72°C, 20" cada 1kb (elongación) y un último paso de 7 minutos a 72°C.
2. Una Taq polimerasa (¿?) de producción "casera" se empleó para las reacciones de comprobación. Dicha polimerasa emplea un tampón 10x (500 mM KCl, 100 mM TrisHCl, 1 % Triton, pH 9 y MgCl₂ 20mM). La amplificación se realizó bajo las siguientes condiciones: 95°C, 3' para desnaturalización inicial, 30-35 ciclos de: 95°C, 30" (desnaturalización), 50-72°C, 30" (hibridación cebador-molde), 72°C, 60" cada 1kb (elongación) y un último paso de 7 minutos a 72°C.
3. Una polimerasa Mutazyme II® (GeneMorph II Random Mutagenesis Kit, Agilent) con elevada tasa de error para las reacciones de mutagénesis aleatoria. Se ajustaron las condiciones para generar 0-2 mutaciones por kilobase, usando 20-25 ciclos y 100-500 ng de molde. Las condiciones empleadas fueron: 95°C 2' para desnaturalización, 20-25 ciclos de: 95°C, 30" (desnat.) 55-72°C, 30" (hibridación) y 72°C, 60" cada kb a amplificar. Un paso final de elongación a 72°C, 10 minutos.

2.2.3. Electroforesis en gel de agarosa

La separación de mezclas de ADN de distintas longitudes se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa. Brevemente, este método consiste en situar una disolución acuosa de ADN en un gel de agarosa y hacer avanzar este ADN a través del gel mediante un campo eléctrico externo. El ADN se desplaza hacia el polo positivo por estar cargado negativamente en sus grupos fosfato. La velocidad a la que se desplaza el ADN a través del gel de agarosa es inversamente proporcional al logaritmo de su longitud total, dado que el gel lo retiene en su avance. Se utilizan moléculas (disueltas en el gel) que se intercalan entre las bases del ADN para dotar a éste de una fuerte fluorescencia que permite detectar, bajo luz UV, en qué posición del gel se encuentra.

Para realizar el gel de agarosa se empleó un tampón TBE 0.5x (Tris-HCl 45mM, ácido bórico 45mM, EDTA 1mM; pH = 8.3) disuelto en agua destilada y se empleó una cantidad de 0,7- 2 gramos de agarosa VWR). La disolución de agarosa en TBE 0.5x se conservó a 60°C, y sólo se le añadió el agente intercalante (2-5 µl SafeView Classic, Applied Biological Materials), o Bromuro de Etidio 0.7mg/ml (Eurobio life science)) al ponerlo en el molde para gelificar.

Para cargar las muestras en el gel se empleó un tampón de carga (DNA Gel Loading Dye (6X) - Thermo Fisher Scientific) y se cargó también, en otro pocillo, un patrón de bandas comercial elegido en función de la longitud del ADN a separar/extraer: GeneRuler 100bp DNA ladder plus (Fermentas) fragmentos menores de 1kb e HyperLadder (BioLabs) para fragmentos más largos. La electroforesis se realizó empleando cubetas horizontales (BioRad) y se emplearon voltajes entre 90 y 130 V.

2.2.4. Extracción de ADN desde gel de agarosa

Esta técnica se realizó empleando un transiluminador GelDoc 2000 (BioRad) para localizar la banda fluorescente de ADN marcado con un agente intercalante, se cortó la zona del gel que contenía dicho ADN y se disolvió y separó dicho ADN de la agarosa y otros contaminantes presentes mediante un kit de extracción comercial (GeneJET Gel Extraction Kit - Thermo Fisher Scientific). Finalmente se eluyó en un buffer Tris/HCl a pH 8.5 o agua destilada.

2.2.5. Digestión enzimática de ADN

Para eliminar el ADN biológico que sirvió como molde para la PCR se empleó la enzima DpnI (FastDigest DpnI - Thermo Fisher Scientific) que reconoce secuencias GATC metiladas en la posición 6 de la adenina. El fundamento de esta técnica es que *in vivo* *Escherichia coli* utiliza una Dam metilasa para marcar el ADN propio recién replicado en esas posiciones, pero en la replicación *in vitro* que se produce en una PCR el ADN nuevo no queda marcado. Esto es útil cuando se emplean vectores de clonación como se explica más abajo.

Para la reacción se emplea hasta 1 µg de ADN, 1 µl de la disolución comercial de enzima, 2 µl del tampón FastDigest 10x y agua desionizada hasta hacer 20 µl. El ADN se digiere en 5 minutos a 37°C y la enzima se desnaturaliza calentando a 80°C durante 5 minutos.

2.2.6. Purificación de ADN

Tras realizar protocolos como la PCR, la digestión enzimática o el ensamblaje Gibson se empleó un kit comercial (GeneJET PCR Purification Kit - Thermo Fisher Scientific) para limpiar la muestra de ADN de enzimas, y otros contaminantes y cambiar el buffer por agua desionizada.

2.2.7. Cuantificación de ADN

Para conocer la concentración de ADN en las muestras se midió la absorbancia a 260 nm con un espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific) que permite medir la absorbancia de muestras muy pequeñas (0,5 - 2 µl) en todo el espectro UV cercano y visible, para estimar además la presencia de ARN, proteínas y otros contaminantes.

2.2.8. Método de ensamblaje isoterma o Gibson assembly

El método de ensamblaje Gibson o ensamblaje isoterma se basa en la acción conjunta de tres enzimas para empalmar y sellar dos secuencias solapantes en los extremos de una o más cadenas de ADN. Esas tres enzimas son una exonucleasa que digiere 5'→3', una ADN polimerasa y una ligasa T4. Esta técnica se emplea para unir fragmentos de ADN y es la que he empleado en esta tesis para clonar todos los genes que he necesitado, en diversos vectores.

El mecanismo en detalle consiste en: 1) la retirada por la exonucleasa T5 de algunos nucleótidos en la hebra que presenta el extremo 5' en cada cadena de ADN. 2) Esto deja la otra hebra (extremo 3') en forma de cadena sencilla; 3) los extremos 3' de cadena sencilla hibridan entre sí. 4) La ADN polimerasa rellena los nucleótidos de más que haya retirado la exonucleasa. 5) La ADN ligasa sella ambas cadenas. Lo interesante de todo este proceso es que se puede realizar sin cambiar la temperatura, usando todas las enzimas simultáneamente en un mismo medio de reacción y virtualmente se pueden ensamblar tantas moléculas como se desee, siempre y cuando sus extremos se solapen.

Se prepararon 6 ml de stock del medio de reacción (3 ml de 1M Tris-HCl pH 7.5, 150 µl de MgCl₂ 2M, 240µl dNTPs 100mM, 300 µl DTT 1M, 1,5 g de PEG 8000, 300 µl de NAD 100mM y 2 ml de agua desionizada) que se almacenó a -20°C. El stock con la mezcla de enzimas se realizó añadiendo 0,3 µl de exonucleasa T5 (Epicentre), 5 µl Phusion (Thermo Scientific), y 40 µl de Taq ligasa (New England BioLabs) en una disolución de 175 µl de agua milliQ y 80 µl del tampón arriba descrito. El volumen de reacción final son 15 µl de la mezcla de enzimas y 5 µl de agua en los que hay disueltos 100 ng del fragmento de ADN amplificado del vector y una cantidad equimolar de el/los fragmento(s) a insertar. La reacción se realiza en un termociclador, a 50°C durante 1 hora.

Se emplearon fragmentos de ADN amplificados por PCR y purificados como se explica más arriba y los que contenían un marcador de selección (generalmente los provenientes de amplificar el vector de clonación) fueron digeridos con DpnI para optimizar el rendimiento de la reacción y minimizar el número de transformantes conteniendo solo copias del vector.

1 µl del producto de reacción se empleó como molde para una PCR de comprobación de la ligación, usando oligos situados en vector e inserto.

2.2.9. Microdiálisis

Los plásmidos naturales o fabricados por ensamblaje Gibson por lo general estaban suspendidos en disoluciones con alto contenido en sales y enzimas, para eliminar estas sales fueron microdializados situando una gota de ~20 µl de esta suspensión sobre filtros Millipore GS de 0,05 µm de tamaño de poro, flotando en agua MilliQ en una placa Petri y permitiendo el intercambio salino durante 30-60 minutos.

2.2.10. Producción de células electrocompetentes.

Los plásmidos naturales y los producidos por ensamblaje Gibson se introdujeron por electroporación en cepas de *Escherichia coli*. Para ello se generaron células electrocompetentes con el siguiente protocolo:

1. Se cultiva 18-24 horas la cepa elegida en LB a 37°C.
2. Se refresca el cultivo diluyendo 1 ml del cultivo saturado en un matraz de 200 ml de LB y se cultiva a 37°C hasta que éste alcanza una densidad óptica (a 600 nm) de 0.5-0.7.
3. Se reparte el cultivo en tubos Falcon de 50 ml previamente enfriados en hielo, y se centrifugan a 4°C durante 15' a 4000 rpm.
4. Se elimina todo el sobrenadante y se resuspende el pellet de células en agua milliQ enfriada en hielo. Se repite el paso de centrifugación. Este paso se realiza dos veces.
5. Se elimina el sobrenadante. Se resuspende el pellet en una mezcla de agua y glicerol al 10% previamente enfriada y se reparte en Eppendorf enfriados en hielo seco, en alícuotas de 50 µl que se guardan a -80°C.

Para transformar estas células electro competentes se añaden 1-20 µl del producto de reacción de ensamblaje Gibson previamente microdializado a las alícuotas, manteniendo estas siempre en hielo. Se sitúa la mezcla en una cubeta de electroporación (genePulser, BioRad) de 2 mm de paso previamente enfriada. Se realiza la transformación mediante un pulso eléctrico de ~2,5kV durante 5-6 ms entre las láminas metálicas de la cubeta, producido por un electroporador Micropulser (BioRad). Acto seguido se resuspenden las células electroporadas en 1 ml de LB a 37°C, se incuba 1-2 horas a 37°C con agitación para que se recuperen del shock y expresen el gen de resistencia a antibiótico del plásmido introducido y se reparte el ml de cultivo en placas Petri con LB agar y antibiótico.

2.2.11. Integración de ADN de interés en el cromosoma de *E.coli*

Para la integración de ADN en el cromosoma de *E.coli* se empleó el sistema pOSIP (St-Pierre *et al.*, 2013) que consiste brevemente en la clonación de una secuencia de ADN de interés en el vector “suicida” de clonación pOSIP (cedido por David Bikard), que contiene un origen de replicación y del plásmido R6K (sólo replica en cepas conteniendo la proteína de replicación π , codificada por el gen *pir*). El sistema codifica, además, una integrasa del fago 186 que reconoce el sitio de inserción de este profago en el cromosoma de *E.coli* e inserta espontáneamente el vector linealizado en esta posición. La selección de inserciones puede realizarse gracias a un gen de resistencia a kanamicina flanqueado por sitios FRT que permiten eliminar el marcador de resistencia, una vez se ha comprobado que una inserción correcta en el cromosoma.

Los genes de interés a integrar se insertaron en el vector pOSIP mediante ensamblaje Gibson, se introdujo por electroporación en una cepa DH5 α *pir*⁺ (que puede replicar el vector, pero no tiene el sitio de inserción del fago 186) y se cultivaron los transformantes durante 18-24 horas para obtener muchas copias de dicha construcción. Finalmente se extrajo el plásmido mediante miniprep y se electroporó en una cepa MG1655 (que contiene el sitio de inserción, pero no la proteína de replicación). Se seleccionaron en placas Petri con LB agar + kanamicina los transformantes y se comprobaron por PCR.

La cepa a la que se insertaron los genes del T4SS de pKM101 se comprobó, además, estudiando su capacidad para movilizar un plásmido conteniendo la región *mob* de pKM101 (*oriT-traiJK*).

Las cepas en las que se insertaron los genes de resistencia a trimetoprim, cloranfenicol y gentamicina se comprobaron plaqueando en LB agar más el correspondiente antibiótico.

En algunos casos se extrajo el gen de resistencia a la kanamicina (gen *aphA*) mediante el plásmido pE-FLP que contiene las flipasas necesarias para escindir la secuencia de ADN de su sitio de inserción gracias a las secuencias FRT que flanquean al gen. Dicho plásmido (derivado del pCP20 del protocolo clásico de inserción cromosómica (Datsenko and Wanner, 2000)) además tiene un replicón termosensible, por lo que basta introducirlo por electroporación y crecer los transformantes a 37°C.

2.2.12. Mutagénesis dirigida

Cuando se deseó introducir una mutación puntual en un gen (en nuestro caso las adhesinas de pKM101 y R388), se realizó una variante del protocolo de ensamblaje Gibson:

1. Se sintetiza el clon por ensamblaje Gibson, con la secuencia natural del gen.
2. Se introduce por electroporación en una *E.coli* con *dam* metilasa y después de incubar 24 horas se extrae por miniprep.
3. Se diseña un oligonucleótido largo (60 pb) que solapa con el clon en la región que se desea mutar y contiene, a unas 20 bases de su extremo 3', la base o bases mutadas.
4. Se diseña el oligo complementario a las 20 bases del extremo 5' del oligo anterior.
5. Se diseña una pareja de oligos complementarios en la región más alejada posible de la zona a mutar.
6. Se realizan dos PCR: cada una de ellas amplifica la mitad del clon, y uno de los fragmentos amplificados contiene la mutación.
7. Se digiere con DpnI (doble de tiempo de digestión) para eliminar todas las copias del clon original.
8. Se ensamblan ambas mitades por el método Gibson, se microdializa e introduce en *E.coli* por electroporación. Plaquear en LB agar + antibiótico.
9. Miniprep de las colonias positivas y comprobación por secuenciación Sanger.

2.2.13. Comprobación mediante secuenciación

Para comprobar la correcta inserción de secuencias de ADN en los vectores de clonación o en el cromosoma bacteriano se extrajo por miniprep el plásmido construido, o se amplificó dicha región cromosómica por PCR, y una muestra conteniendo 1 µg de ADN con 25 pmol de cebador disueltos en 13 µl de agua milliQ fueron enviados a StabVida (Caparica, Portugal). Allí la secuencia fue obtenida por secuenciación Sanger.

2.3 Métodos de conjugación

2.3.1. Conjugaciones en placa de 24 pocillos

Se prepararon (4-5 días antes de cada experimento, para permitir que se secasen correctamente a temperatura ambiente) placas de 24 pocillos conteniendo cada pocillo 1 ml de LB agar sólo, LB agar con glucosa al 0,5% en peso, LB agar con arabinosa 100 μ M o LB agar con IPTG 0,5mM (en experimentos con regulación transcripcional por el promotor Para o Plac).

El protocolo se puede separar en 7 pasos:

1. Crecimiento overnight de los cultivos.
2. Mezcla y plaqueo en pocillos de LB agar.
3. Conjugación y crecimiento en el pocillo.
4. Suspende con PBS.
5. Diluciones seriadas en PBS.
6. Plaqueo en medio selectivo.
7. Contaje de colonias donadoras, receptoras y transconjugantes.

1. Se cultivaron durante 18-24 horas a 37°C en matraces con 10 ml de LB (con selección por antibiótico y en agitación (120 rpm)) tanto las cepas de donadores (cepas de *E.coli* conteniendo plásmido(s) conjugativo(s) o movilizable(s)) y las cepas de receptores, teniendo cada una un marcador de resistencia cromosómico distinto.

1b. (opcional, recomendado) Se lavaron los cultivos centrifugando 10' a 4000g en tubos de 10 ml y se resuspendieron en LB nuevo sin antibiótico. Se dejaron crecer durante 3h a 37°C.

2. Se volvieron a centrifugar 10' a 4000g en tubos de 10 ml y se resuspendieron en 1 ml de LB. Se mezclaron 10 μ l del cultivo concentrado de donadores en el mililitro de cultivo de receptores y se plaquearon 15 μ l de esta mezcla en el LB agar contenido en las placas de 24 pocillos. (Nota: En ocasiones puntuales se emplearon otras proporciones donador: receptor, pero salvo que se diga lo contrario, todos los experimentos emplean una proporción 1:100).

3. Se incubó a 37°C sin agitación a tiempos variables para que la conjugación tuviera lugar.

4. Se detuvo la conjugación pipeteando fuertemente sobre la superficie 1 ml de PBS.

5. Se hicieron diluciones 1/10 en serie de esta suspensión con PBS.

6. Finalmente se plaquearon 100 μ l de estas diluciones y se extendieron con bolitas de vidrio en placas de Petri conteniendo LB agar y combinaciones de antibióticos para seleccionar donadores (marcador cromosómico más el del plásmido), receptores más transconjugantes (marcador cromosómico de los receptores) y transconjugantes (marcador cromosómico de los receptores más el del plásmido). Se plaqueó por triplicado para mejorar la precisión sin que supusiera un gasto excesivo de material y tiempo.

7. Se dejaron crecer las placas a 37°C durante 24-48 horas y se contaron las colonias crecidas en cada placa usando un contador automático (Scan 300, Interscience) o bien a mano.

2.3.2. Conjugaciones en líquido

El procedimiento fue idéntico al empleado en el protocolo anterior, solo que los pocillos contenían LB líquido en lugar de Lb agar. El tiempo de conjugación empleado fue 1 hora, 37°C, sin agitación.

2.3.4. Conjugaciones con el sistema intimina-tir

El sistema intimina-receptor translocado de intiminas (tir, en sus siglas en inglés) consta de dos cepas y está basado en la expresión de dos proteínas de superficie: intimina y receptor de intimina traslocado, que se expresan cada una en una cepa, se reconocen mutuamente y establecen entre sí uniones específicas, favoreciendo así la adhesión entre las dos cepas que las expresan.

Una de estas proteínas (un dominio en barril β del gen de la intimina, una proteína extracelular) está insertada en el cromosoma de *E.coli* K-12 (MG1655 Δ fimA-H) y se expresa constitutivamente, esta cepa se denomina EcM1. La otra proteína (el dominio extracelular del receptor de intiminas ó *tir*) está condicionalmente expresada bajo el promotor Plac en un vector pNVtir. La primera cepa EcM1 actúa como receptora en conjugaciones con R388, que es aportado en la cepa donadora (Bw27783, a la que se le ha transformado previamente la construcción pNV::tir1).

Se llevó a cabo el protocolo habitual de conjugación, reprimiendo la expresión del gen tir cultivando en LB suplementado con glucosa 0,5% durante toda la noche. Posteriormente se indujo con IPTG 100uM durante la fase de preincubación (3 horas). Los cultivos en fase estacionaria se concentraron 10 veces en LB fresco y se mezclaron en proporciones 1:100. La conjugación se realizó tanto en líquido (15 μ l de la mezcla concentrada de conjugación en 1 ml de LB en placa de 24 pocillos, sin agitación) como en sólido (protocolo habitual), durante 1 hora a 37°C. Se realizaron conjugaciones probando las cuatro combinaciones posibles entre donadores con/sin intimina (EcMA/MG1655) y receptores (Bw27783) con/sin receptor de intiminas (pNV::tir1).

2.3.4. Conjugaciones en turbidostato

Para este experimento se mezclaron tres poblaciones isogénicas en crecimiento exponencial:

-JRG12: Bw27783:mKate, con un gen mKate de fluorescencia roja insertado en el cromosoma.

-JRG279: Bw27783 + pAR119, un plásmido R1drd19 conjugativo en líquido, con un gen yfp de fluorescencia amarilla.

-Bw27783 + pBAD33::TraST, un plásmido que expresa los genes de exclusión de entrada del plásmido R1 y, por tanto, hace a la célula resistente a la entrada de dicho plásmido.

Para mantener durante 48 horas un cultivo en crecimiento exponencial continuo se dispusieron dos bombas: una de entrada de medio y otra de salida, con un flujo constante de 6 ml/hora, alimentando un reactor de 3 ml, con agitación muy suave, en una cámara oscura a 37°C. Dicho reactor tenía asimismo una entrada de aire. Tanto la entrada de medio (sales M9 + 10% LB + arabinosa 50 μ M) como la de aire se hacen a través de un filtro de membrana Corning de 0,2 μ m (Thermo Scientific).

Las muestras, de 50 μ l, se recogen cada hora y se diluyen en 950 μ l de PBS1x filtrado (para evitar la autofluorescencia que provoca autoclavar el PBS). Dichas muestras se guardan a 4°C y posteriormente se analiza la evolución de las tres poblaciones por citometría de flujo y microscopía de fluorescencia.

2.3.5. Citometría de flujo

Se pasaron 10 μ l de muestra por triplicado por un citómetro de flujo, con velocidad de flujo lenta y con los siguientes valores de voltaje para cada canal: FSC: 554V, SSC: 467V, Y3 (mKate): 748V, FITC (YFP): 487V.

2.3.6. Microscopía de fluorescencia

Asimismo, se plaquearon las muestras sobre gel de agarosa y fijaron en un porta para observarlas y fotografiarlas con un microscopio de fluorescencia y cuantificar las poblaciones empleando el software ImageJ (NIH).

2.3.7. Medidas de crecimiento

Se cultivaron en LB o en medio M9 + 10% de LB líquido y arabinosa 50 μ M las cepas de interés y sus cepas control durante 18 horas aprox. Se llevaron a la misma concentración, midiendo previamente la densidad óptica a 600nm con un fluorímetro (Ultrospec 10, Amersham Biosciences) y diluyendo en medio fresco. Se hicieron diluciones 1/1000 en el mismo medio y se dispusieron 150 μ l en pocillos de una placa *microtiter* de 96 pocillos, con 8 réplicas por cada cepa.

Dichas placas se introdujeron en un fluorímetro para placas Victor3 (Perkin-Elmer) y se incubaron durante 14 horas a 37°C con agitación, tomando medidas de la OD₆₀₀ cada 15 minutos y añadiendo medio para compensar la evaporación.

Los valores de absorbancia frente al tiempo permitieron calcular el tiempo de generación: obteniendo el logaritmo de las OD₆₀₀ entre 0.2 y 0.6 y realizando una regresión lineal por mínimos cuadrados. La pendiente α de la recta obtenida permite calcular el tiempo de generación como $t = \ln 2 / \alpha$.

2.3.8. Eficiencia de conjugación y movilización

Un día después de cada experimento de conjugación, se contaron las colonias de receptores (R), donadores (D) y transconjugantes (T) en las placas de LB agar. Se hizo una media de los valores de donadores y transconjugantes. Se hizo una primera aproximación a la eficiencia de conjugación/movilización como T/D. Dado que hemos observado que este valor se distribuye de manera lognormal sacamos el logaritmo en base 10 de cada resultado y, a partir de ahí, una media de todos estos valores y un intervalo de confianza al 95% (intentando tener como mínimo 9 repeticiones: 3 réplicas técnicas, 3 experimentos independientes, dado que es una medida sujeta a mucho ruido).

Para obtener medidas más robustas de conjugación se emplea el método de punto final (Simonsen *et al.*, 1990), que usa como medida la eficiencia de conjugación γ (en $\text{ml} \cdot \text{cél}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$):

$$\gamma_{max} = \psi_{max} \ln \left(1 + \frac{[T] \cdot [N]}{[R] \cdot [D]} \right) \cdot \frac{1}{[N] - [N_0]}$$

Donde ψ es la tasa de crecimiento máxima (h^{-1}), $[T]$ la densidad de transconjugantes, $[D]$ de donadores, $[R]$ de receptores y $[N]$ la suma de todas ellas, con $[N_0]$ la densidad total al comienzo de la conjugación. Se emplea este método porque es, hasta cierto punto, independiente de la proporción D:R y del tiempo de conjugación y por tanto permite comparar eficiencias de conjugación entre diferentes estudios.

Objectives

3. Objectives

1. To obtain a super-conjugator strain that might be able to mobilize the constructs from PLASWIRES Project with efficiencies of one transconjugant per donor or greater. In other words: to develop a wire strain that allows information transmission without signal loss.
2. Characterization of limiting factors in conjugation efficiency, either intrinsic or environmental.
3. To define and model the dynamics of conjugative plasmid transmission.

Resultados

4. Resultados

R1. Puesta a punto del protocolo de conjugación sobre placas de LB agar.

Dado que el principal objetivo de esta tesis fue mejorar la eficiencia de conjugación y movilización de R388, nuestro primer objetivo consistió en la puesta a punto de un protocolo de conjugación que generase resultados lo más precisos posibles. Para ello nos propusimos:

- 1) caracterizar las fuentes de fluctuación en el protocolo de medida, para reducirlas en lo posible y así obtener medidas precisas de la eficiencia de conjugación que permitiesen determinar qué estrategias ayudarían a mejorar la misma.
- 2) Probar varios métodos de medida para determinar los más rápidos, eficientes o precisos.
- 3) Determinar las condiciones óptimas para la conjugación de R388.

1.1. Error propagado en la medida de eficiencia de conjugación en el protocolo de conjugación en sólido y plaqueo con bolas de vidrio.

La medida de la eficiencia de conjugación de un plásmido se realiza contabilizando el número de transconjugantes (T) que se obtienen cuando se ponen en contacto una población de bacterias donadoras (D) con una población de receptoras (R), durante un tiempo t . Este protocolo incorpora distintos pasos que pueden esquematizarse en:

8. Crecimiento overnight de los cultivos de D y R. En este paso, diferencias de crecimiento entre los distintos días/cultivos pueden dar lugar a diferencias en la densidad celular
9. Mezcla y plaqueo en pocillos de LB agar. D y R se ponen en contacto sobre una superficie de LB agar. Diferencias en la homogeneidad de la muestra y en la adhesión a la superficie del agar pueden traducirse en fluctuaciones en la tasa de conjugación.
10. Conjugación y crecimiento en el pocillo de las poblaciones de D, R y T. Diferencias en el tiempo de incubación, así como fluctuaciones intrínsecas en la eficiencia de conjugación o las velocidades de crecimiento pueden introducir variaciones en los recuentos finales.
11. Suspender con PBS, para interrumpir la conjugación y plaquear en medio selectivo. Diferencias en la eficiencia de resuspensión, así como en la viabilidad de las células durante el proceso pueden arrojar diferencias en los recuentos.
12. Diluciones seriadas en PBS, para calcular la eficiencia de conjugación. Errores sistemáticos en el pipeteo de volúmenes pueden introducir errores en la estimación final del número de colonias.
13. Plaqueo en medio selectivo, para el crecimiento selectivo de D, T y R
14. Contaje de colonias donadoras, receptoras y transconjugantes a partir de las placas. Las fluctuaciones asociadas al proceso de plaqueo se transmiten a las frecuencias de conjugación calculadas a partir de estas

Como vemos, cada uno de estos pasos introduce un error experimental en las medidas finales de la eficiencia conjugativa. Para estimar la variación en las medidas de eficiencia de conjugación se estudió el ruido asociado a cada uno de los pasos del protocolo. Dado que no es posible analizar aisladamente ciertos pasos del protocolo, se optó por una estrategia secuencial. Para

ello se realizaron medidas de la variación en el número de colonias contadas realizando solo el séptimo paso, a continuación solo el 6º y el 7º, posteriormente el 5º, 6º y 7º pasos, y así sucesivamente hasta computar la variación de cada población en el protocolo completo. El error acumulado se expresó como el coeficiente de variación (en porcentaje), del número final de colonias obtenidas. El error acumulado a medida que se añade cada uno de los pasos del protocolo puede observarse en la Figura R1.

#7. Error asociado al conteo de colonias con contador de placas automático: empleando el contador de placas Scan300 (Interscience) se contaron (5 veces por placa) el número de colonias de *E.coli* crecidas en 20 placas Petri conteniendo LB agar. El error asociado a esta medida se calculó obteniendo el coeficiente de variación de las 5 medidas y haciendo un promedio de los 20 experimentos, que resultó de un **3.6%**.

#6. Error asociado al plaqueo en placa Petri usando bolas de vidrio: Se plaqueó 1 ml de una suspensión de PBS 1x conteniendo 1000-3000 ufc en 10 placas Petri conteniendo LB agar, empleando 100 µl en cada placa y extendiendo el líquido sobre la superficie con bolitas de vidrio. Se repitió el experimento 5 veces y se contaron las colonias de las 50 placas usando el contador automático. El error asociado a cada experimento se calculó como coeficiente de variación, el error total es el promedio de los CV de los cinco experimentos. El error asociado al plaqueo con bolas de vidrio y conteo de colonias automático fue del **17%**. (Cabe destacar que empleando una dilución mayor (100-300 ufc/ml) el error asociado a esta medida asciende al 25%).

#5a. Error asociado a la dilución 1:10 de ufc en PBS 1x: se tomó 1 ml de PBS 1x conteniendo unas $2 \cdot 10^4$ ufc, se dividió equitativamente en 10 Eppendorf que contenían previamente 0.9 ml. Se plaquearon 500 µl de cada Eppendorf en 5 placas (100 µl por placa), se extendió el contenido usando bolitas de vidrio y se contaron las colonias crecidas con el contador automático. El error asociado a la dilución se calculó como la variación entre los promedios de cada grupo de 5 placas, y resultó del **20%**.

#5b. Error asociado a varias diluciones seriadas: Se tomó un pellet de un cultivo crecido overnight en LB (unas 10^9 ufc) y centrifugado 10 min a 4000 rpm; se diluyó en 1 ml de PBS y éste se diluyó 1:10 en 10 Eppendorf conteniendo 0.9 ml de PBS. El contenido de cada uno de ellos se diluyó 1:10 cinco veces y se plaqueó 500 µl del contenido final en 5 placas de LB agar y se contaron las colonias crecidas usando el contador automático. De esta forma podemos calcular el error asociado al proceso de dilución en serie, que resultó del **23%**.

#4. Error asociado a la suspensión con PBS de la mezcla de conjugación: se tomó un pellet de un cultivo crecido overnight en LB (unas 10^9 ufc) y centrifugado 10 min a 4000 rpm; se diluyó en 1 ml de PBS y 15 µl de esta suspensión se plaquearon en un pocillo conteniendo 1ml de LB agar en una placa de 24 pocillos (10 repeticiones). Se dejó secar la gota durante un minuto y se levantó pipeteando contra la superficie 1 ml de PBS y dicha suspensión se guardó en un Eppendorf (uno para cada pocillo).

El contenido de cada uno de ellos se diluyó 1:10 cinco veces y se plaqueó 500 µl del contenido final en 5 placas de LB agar y se contaron las colonias crecidas usando el contador automático. De esta forma podemos calcular el error asociado al proceso de plaqueo/levantamiento en el pocillo de LB agar. El error asociado al plaqueo del pellet, levantamiento, dilución, plaqueo y conteo fue del **32%**.

#3. Error asociado al crecimiento en el pocillo de conjugación: Se realizó el mismo protocolo que en el caso anterior, pero esta vez poniendo a 37°C la placa de 24 pocillos después de dejar secar la gota y antes de levantarla con 1 ml de PBS. Se plaquean 10 pocillos y las diluciones se plaquean en 5 placas. El resultado fue un error asociado del **20%**.

#2. Variación asociada al proceso de mezcla y conjugación: Se incubaron overnight dos cultivos isogénicos de *E.coli*, uno portando un plásmido conjugativo R388 (donadoras) y otro cultivo sin plásmido (receptoras). Se centrifugaron y los pellets se resuspendieron en 1 ml de LB. 10 µl de la suspensión de donadores se mezcló en el mililitro de suspensión de receptores. 15 µl de esta mezcla se plaquearon en pocillos conteniendo LB agar (6 réplicas) y se dejaron a 37°C durante una hora. Se levantaron las mezclas con 1 ml de PBS, se diluyeron en serie y se plaquearon en placas de LB agar con antibióticos para seleccionar las poblaciones de donadores, receptores y transconjugantes recién formados (5 placas cada condición). Se contaron las colonias con el contador de placas automático.

Variación en las colonias contadas debida a todo el proceso: **16-20%** Donadores y Receptores. **55%** Transconjugantes. Esta es la variación inherente a las réplicas técnicas, determinaciones experimentales de la frecuencia de conjugación a partir de un mismo cultivo celular.

#1. Variación asociada al crecimiento overnight del preinóculo: Se realizó el mismo protocolo que en el punto 3, solo que esta vez la procedencia del cultivo overnight inicial eran 10 matraces distintos (de una misma cepa crecida en las mismas condiciones) en lugar de uno sólo. Se centrifugaron, diluyeron en PBS, plaquearon, crecieron 1h a 37°C en el pocillo con LB agar y fueron levantados y diluidos con PBS, finalmente se plaquearon y contaron las colonias con un contador de placas automático.

La variación asociada al proceso completo en el número de colonias contadas fue del **52%**.

El error intra-grupal (las colonias en las 5 placas que provienen de un mismo pocillo inicial) es del 24% mientras que el error inter-grupal (la comparación entre los promedios de los 10 pocillos iniciales) es del 46%.

Variación total asociada al protocolo de conjugación en pocillo de LB agar con bolas de vidrio: Se realizó el mismo protocolo que en **#1**, pero esta vez partiendo de seis cultivos distintos de donadores y seis de receptores. Cada pareja donador-receptor solo se plaqueó en un pocillo (6 pocillos en total).

Variación en las colonias contadas: **32-34%** Donadores y Receptores. **40%** transconjugantes. Esta es la variación inherente a las réplicas biológicas. El coeficiente de variación de los logaritmos del cociente Tc/Don es del **120%** (n=6).

Variación asociada al protocolo de conjugación en líquido: Todo lo descrito hasta el momento aplica para la medición de la eficiencia de conjugación sobre superficie sólida, que es el medio en que mejor conjugan nuestro plásmido modelo R388. Sin embargo, existen muchos plásmidos conjugativos que conjugan también en suspensión en líquido, e incluso mejor que en sólido.

El protocolo de conjugación en líquido no requiere el plaqueo sobre LB agar y la resuspensión posterior en PBS, por lo que, a priori, debería estar sujeto a menos fluctuación. Las fuentes de ruido son el crecimiento de los cultivos, el ruido inherente a la conjugación, la dilución seriada en PBS y el plaqueo en medio selectivo.

Se repitió el protocolo de conjugación empleando el plásmido R1drd19, un plásmido conjugativo del grupo IncF que conjugan en líquido, el coeficiente de variación en las colonias contadas fue: **10-12%** en donadores y **15%** en transconjugantes. El coeficiente de variación de los logaritmos del cociente Tc/Don es del **62%** (n=16).

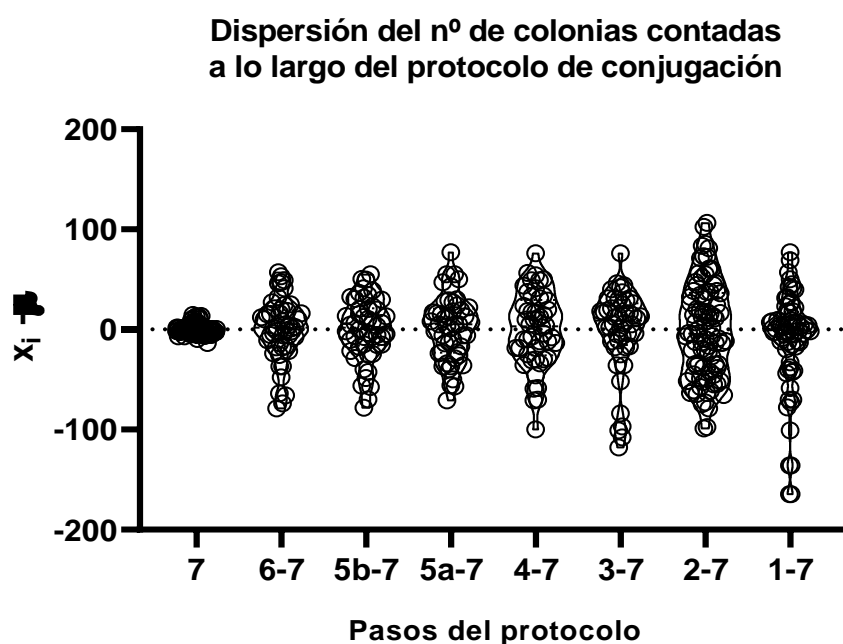


Figura R 1. Medida de la dispersión experimental en el número de colonias obtenidas a lo largo del protocolo de conjugación. En el eje y se representa la desviación de cada conteo de colonias con respecto a la media de colonias en cada experimento. En el eje x se indican los pasos del protocolo de conjugación por los que ha pasado la muestra inicial: a la izquierda de la figura sólo han pasado por el conteo automático de colonias (paso 7), hacia la derecha se representan valores obtenidos realizando progresivamente más pasos hasta que, en el extremo derecho se ha realizado todo el protocolo de conjugación (pasos del 1 al 7). La numeración corresponde a los pasos del protocolo detallados en el párrafo R1.1 de la sección de Resultados.

Para poder optimizar el sistema PLASWIRES, necesitamos medir con precisión las eficiencias de conjugación y movilización de nuestras construcciones y, para ello, hacer medidas precisas y reproducibles.

Para ello hemos analizado las fuentes de fluctuación experimental y aquellos factores que limitan la reproducibilidad para tomarlos en cuenta a la hora de comparar los resultados cuando, más adelante, intentemos optimizar la eficiencia del sistema conjugativo.

Realizando un análisis de componentes principales (PCA en inglés) de las distribuciones de las medidas en función de cada paso del protocolo concluimos que los factores que más contribuyen a la dispersión de la medida son el plaqueo de la mezcla de conjugación en el pocillo de LB agar y el plaqueo de las diluciones en las placas de LB agar con antibiótico.

El primer factor, el plaqueo en LB agar de la mezcla de conjugación, es inevitable dado que el sistema PLASWIRES está basado en plásmidos que conjugan sobre superficie sólida. Con respecto al segundo factor, el plaqueo con bolas de vidrio, se puede variar y optimizar el protocolo para reducir la dispersión.

La división entre el número de colonias de transconjugantes y número de colonias de donadores es el equivalente a dividir una distribución de Galton o log-normal y una distribución gaussiana o normal. El resultado de esta división es una distribución log-normal. La población de donadores está normalmente distribuida porque su número es el resultado de la adición simple de nuevos individuos debido al crecimiento vegetativo. La población de transconjugantes está log-normalmente distribuida porque su crecimiento es el resultado de la multiplicación del factor crecimiento vegetativo y del factor crecimiento por transmisión horizontal.

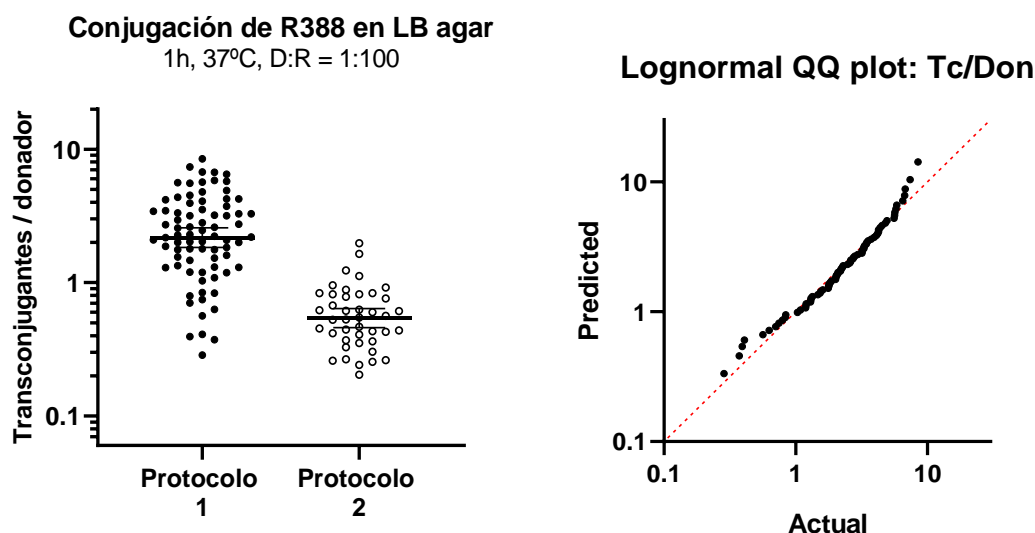


Figura R 2. La distribución de la FC es Log-normal. A) FC obtenida empleando el protocolo de conjugación optimizado, descrito en la sección R1.2 de resultados, y el protocolo convencional de conjugación, descrito en la sección R1.1. En el eje y se representa la FC, calculada como el cociente del número de colonias de transconjugantes entre el número de colonias de donadores. Cada punto representa el promedio de tres réplicas técnicas. En el eje x se indica el protocolo seguido. B) Ajuste de los resultados experimentales a una distribución Lognormal. La gráfica muestra el análisis cuantil-cuantil (QQ) de los valores mostrados en A). En el eje x se muestra el valor de FC obtenido experimentalmente. En el eje Y se muestra el valor esperable para cada punto, asumiendo que estos valores pertenecen a una distribución Lognormal ideal con una media igual a la obtenida experimentalmente.

Ambas distribuciones (protocolo #1, n=83; protocolo #2, n=41) son log-normales (test Shapiro-Wilk: $W=0.97$, $P=0.16$ y 0.36 respectivamente; test Anderson-Darling $A^*=0.4$, $P=0.38$ y 0.34 respectivamente). En ambos casos, la distribución está ligeramente escorada hacia valores más bajos de lo esperable para una distribución log-normal como se puede ver en el gráfico QQ.

1.2. Optimización del protocolo de conjugación.

Una vez que determinamos las principales fuentes de variabilidad, intentamos disminuir el error experimental en nuestras medidas de la eficiencia de conjugación. Para ello realizamos los siguientes abordajes:

1.2.1. Variación en la medida de eficiencia con el tiempo de incubación:

Una vez inoculados los cultivos de D y R, estos se incuban durante un tiempo variable para obtener cultivos con altas densidades celulares con los que realizar las conjugaciones. Se probó el efecto sobre la frecuencia de conjugación de variar estos tiempos de incubación (medido como el tiempo transcurrido entre poner el inóculo inicial y centrifugar el cultivo saturado antes de poner a conjugarse)

No se encontró ninguna diferencia significativa en la eficiencia de conjugación entre los cultivos incubados 6, 9, 12,

15, 18, 21 o 24 horas, aunque los coeficientes de variación en los resultados fueron mayores para tiempos de incubación altos (21 y 24 horas). Dado que periodos de 15-18 h. correspondían aproximadamente a una noche de incubación, se optó por estos tiempos por cuestiones prácticas.

Conjugación de R388 en LB agar

1h, 37°C, D:R = 1:1

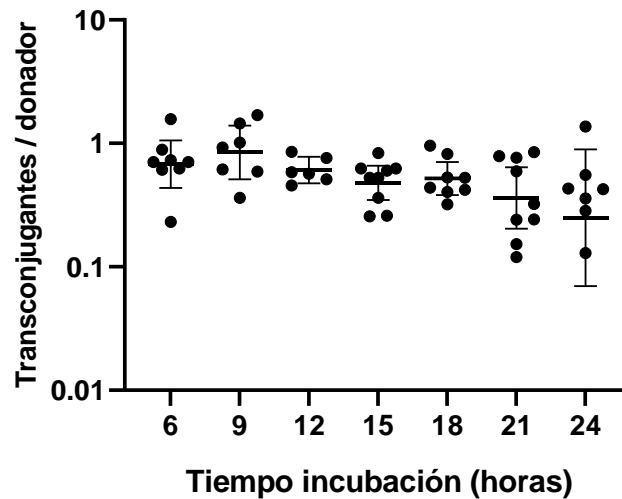


Figura R 3. Efecto del tiempo de incubación de los inóculos sobre la eficiencia conjugativa. FC de R388 en sólido durante 1h a 37°C en proporciones D:R = 1:1. En el eje y se representa la FC, expresada como (T/D). Cada punto representa el promedio de 3 réplicas técnicas. Las barras de la figura indican la media geométrica y el intervalo de confianza (95%). En el eje x se muestra el tiempo transcurrido (en horas) desde el inóculo de D y R y el inicio de la conjugación.

1.2.2. Variación en la medida de eficiencia al refrescar los inóculos: Una vez crecidos los cultivos de D y R, es posible refrescar estos cultivos, centrifugando y resuspendiendo las células en medio fresco. Esto elimina los productos de deshecho y otros factores que las células hayan podido producir en su entrada en la fase estacionaria del crecimiento. Se comprobó el efecto de lavar y dejar crecer 3 horas a 37°C (en medio fresco sin antibióticos) los inóculos ya crecidos overnight de donadores y receptores, antes de concentrarlos y mezclarlos para conjugarse.

Hay una diferencia significativa (test t Student, $n=16$, $P=0.002$) entre ambos protocolos:

- Media geométrica preincubando: 1.9 Tc/Don.
- Media geométrica sin preincubar: 0.7 Tc/Don.

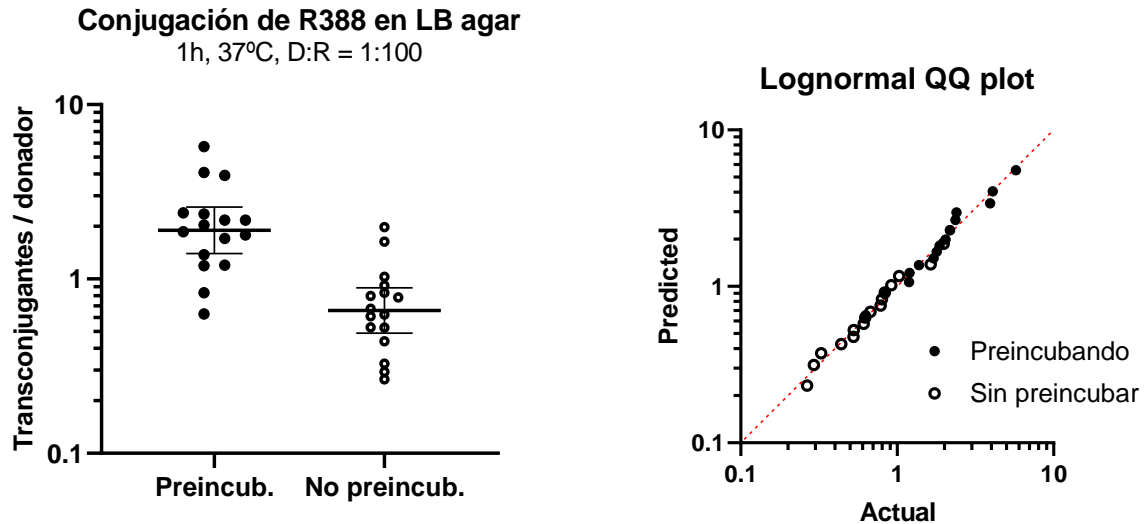


Figura R 4. Efecto de la preincubación de D y R sobre la FC. Resultados correspondientes a conjugaciones de R388 en medio sólido durante 1 hora a 37°C en proporciones D:R=1:100. Los inóculos preincubados corresponden a cultivos crecidos en LB con antibióticos durante 15 h y después crecidos en medio fresco durante 3 horas antes de la conjugación. Los cultivos no preincubados fueron puestos a conjuguar inmediatamente después de la fase de crecimiento (18 h en total). A) FC expresada como T/D en función de la preincubación de D y R (eje x). Cada punto representa el promedio de 3 réplicas técnicas. Se representan asimismo la media geométrica y el intervalo de confianza (95%). B) Gráfica correspondiente al análisis QQ de los valores representados en A: la línea de puntos rojos representa el modelo (una distribución log-normal ideal), en el eje y se indica el valor esperable para cada medida, en función del k-cuantil que ocupa, en el eje de las x se representa el valor medido para dicho punto. Los puntos son los valores de transconjugantes por donador de cada experimento en la gráfica A.

Ambas muestras presentan una distribución lognormal: los logaritmos de las medidas Tc/Don en cada experimento se ajustan a una curva gaussiana (test Shapiro-Wilk, $W=0.97$ en ambos casos, test Anderson-Darling $A^2=0.26$ y 0.21 respectivamente). Se optó por incorporar al protocolo estándar de conjugación el paso de preincubación 3 horas a 37°C en LB fresco.

1.2.3. Variación de la medida de eficiencia en función de la superficie: Nuestro plásmido modelo solo es capaz de conjuguar de manera eficiente cuando las células se encuentran sobre una superficie sólida. Para evaluar si el área de la superficie sobre la que se realiza la conjugación tiene un efecto significativo sobre la frecuencia, comparamos las frecuencias de conjugación obtenidas en placas de 24 y 96 pocillos, que tienen, respectivamente 16 y 3 mm de diámetro. Los pocillos de las placas de 24 contuvieron 1 ml de LB agar, mientras que las de 96 se rellenaron con 0.15 ml. Se midieron las eficiencias de conjugación de R388 como Tc/Don. La cepa empleada fue Bw27783 en ambos casos. En este ensayo se preincubaron los cultivos de donadores y receptores, puesto que se había comprobado previamente que esto mejoraba la frecuencia de conjugación.

Conjugación de R388 sobre LB agar

1h, 37°C, D:R = 1:100.

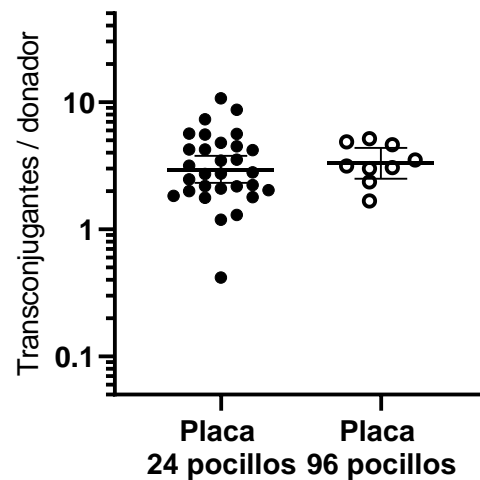


Figura R 5. Efecto de la superficie de conjugación. Conjugaciones de R388 en sólido durante 1h a 37°C en proporciones D:R = 1:100 en placas de 24 pocillos ($\Phi=1.6$ cm.) y en placas de 96 pocillos ($\Phi=0.3$ cm.). En el eje y se representa la FC (T/D). Cada punto representa el promedio de 3 réplicas técnicas. Se representan asimismo la media geométrica y el intervalo de confianza (95%).

Eficiencia de conjugación de R388 usando placas de 24 pocillos: 2.8 Transconjugantes/Donador (n=30), Intervalo de confianza con $\alpha_{0.05}$ (2.2-3.6 Tc/Don).

Eficiencia de conjugación de R388 usando placas de 96 pocillos: 3.3 Transconjugantes/Donador (n=9), Intervalo de confianza con $\alpha_{0.05}$ (2.5-4.2 Tc/Don).

La comparación entre las distribuciones de los logaritmos de (Tc/Don) de ambas muestras mediante un test t de Student no pareado de dos colas (suponiendo que siguen una distribución normal con la misma varianza), indica que no son significativamente diferentes ($P=0.64$).

Eficiencia de conjugación de dos plásmidos en función del pocillo utilizado:

A continuación, se quiso comprobar si todos los pocillos de la placa daban el mismo resultado. Para ello, se realizó el protocolo de conjugación habitual, y se plaqueó la mezcla de conjugación en distintos pocillos de la placa de 24, para ver si existía una diferencia significativa entre ellos (n=7). Para este ensayo se emplearon los plásmidos conjugativos

pKM101 y RP4, las cepas de donadores y receptores son Bw27783 isogénicas con distinto marcador cromosómico de resistencia a antibiótico.

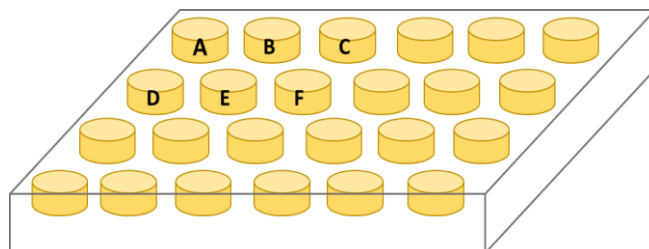
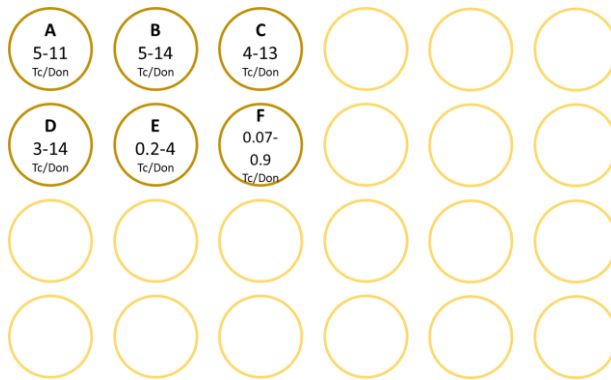


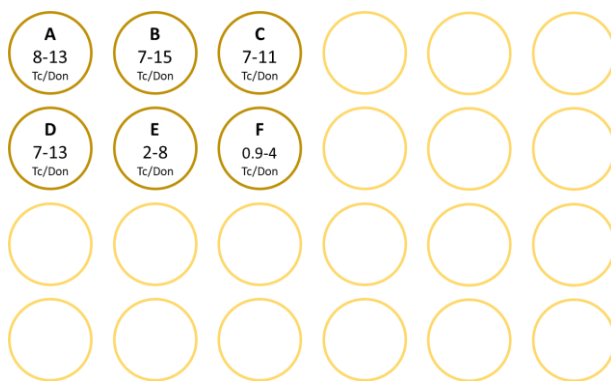
Figura R 6. Representación esquemática de una placa de 24 pocillos. La configuración de esta placa respecto al centro es simétrica, por lo que solo hay 6 tipos de pocillos distintos (marcados con letras en la figura).

A) pKM101



- Pocillo A: Media log = 7.4 Tc/Don. Intervalo confianza $\alpha_{0.05}$ = (5-11 Tc/Don).
- Pocillo B: Media log = 8.6 Tc/Don. Intervalo confianza $\alpha_{0.05}$ = (5-14 Tc/Don).
- Pocillo C: Media log = 7.1 Tc/Don. Intervalo confianza $\alpha_{0.05}$ = (4-13 Tc/Don).
- Pocillo D: Media log = 6.4 Tc/Don. Intervalo confianza $\alpha_{0.05}$ = (3-14 Tc/Don).
- Pocillo E: Media log = 0.9 Tc/Don. Intervalo confianza $\alpha_{0.05}$ = (0.16-4 Tc/Don).
- Pocillo F: Media log = 0.2 Tc/Don. Intervalo confianza $\alpha_{0.05}$ = (0.07-0.9 Tc/Don).

B) RP4



- Pocillo A: Media log = 10.2 Tc/Don. Intervalo confianza $\alpha_{0.05}$ = (8-13 Tc/Don).
- Pocillo B: Media log = 10.2 Tc/Don. Intervalo confianza $\alpha_{0.05}$ = (7-15 Tc/Don).
- Pocillo C: Media log = 8.7 Tc/Don. Intervalo confianza $\alpha_{0.05}$ = (7-11 Tc/Don).
- Pocillo D: Media log = 9.4 Tc/Don. Intervalo confianza $\alpha_{0.05}$ = (7-13 Tc/Don).
- Pocillo E: Media log = 4.2 Tc/Don. Intervalo confianza $\alpha_{0.05}$ = (2-8 Tc/Don).
- Pocillo F: Media log = 1.9 Tc/Don. Intervalo confianza $\alpha_{0.05}$ = (0.9-4 Tc/Don).

Figura R 7. Efecto de la localización del pocillo sobre la eficiencia de conjugación de los plásmidos pKM101 (A) y RP4 (B). Todas las conjugaciones se realizaron en las mismas condiciones experimentales (1h, 37°C, D:R=1:100). Los círculos representan los pocillos de la placa. Los números representan el intervalo de confianza al 95% de los valores de T/D en cada pocillo (n=7).

Se observó una gran diferencia en la producción de transconjugantes en

pocillos del exterior o del interior de la placa. Una inspección de estas sugería que los pocillos del interior de la placa no llegan a secarse de manera completa, y el agua residual impide la conjugación de plásmidos IncP, IncN e IncW, puesto que estos plásmidos necesitan de superficies sólidas para conjugarse. Este extremo se confirmó parcialmente dejando secar las placas durante cinco días. En este caso no se observaron diferencias significativas entre pocillos. Desde este punto en adelante, las placas de conjugación se dejaron secar a temperatura ambiente durante cinco días antes de la realización de los experimentos.

1.2.4. Optimización del paso final de plaqueo. En la sección anterior se observó que una de las principales fuentes de variabilidad en los resultados procedía del plaqueo de las células mediante bolas de vidrio. Para intentar reducir esta variación se probaron varias alternativas: plaqueo por gotas, plaqueo por réplicas y conteo de colonias en citómetro.

Variación asociada al conteo de colonias por el método de “gotas”: es prácticamente idéntico al protocolo de plaqueo con bolas de vidrio, salvo porque se plaquea en el medio selectivo solo

una “gota” de 10 μ l de cada una de las diluciones seriadas (por triplicado) del resultado de la conjugación y se deja secar. Se realizó este experimento con 33 conjugaciones de R388.

La variación promedio (coeficiente de variación) entre las 3 réplicas técnicas (3 gotas de la misma dilución) es del **20%** para las tres poblaciones.

Variación en las colonias contadas: **29%** Receptores, **25%** Donadores, **31%** transconjugantes.

Selección directa de transconjugantes o por réplica: Se comprobó si la proporción de colonias crecidas en LB agar era la misma cuando se plaquea directamente en medios selectivos para cada población, o cuando se plaquea primero en medio selectivo para seleccionar colonias portando el plásmido (Donadores y transconjugantes) y luego se realizan réplicas de esas colonias en medio selectivo para identificar donadores y transconjugantes.

El test t de Student pareado con $\alpha_{0.05}$ indica que no se produce un sesgo empleando una técnica u otra ($P = 0.28$, media de las diferencias = 0.05 Tc/Don, $n=9$). El coeficiente de variación de las 9 medidas es del **33%** para el método de plaqueo directo y del **26%** para el método de réplicas.

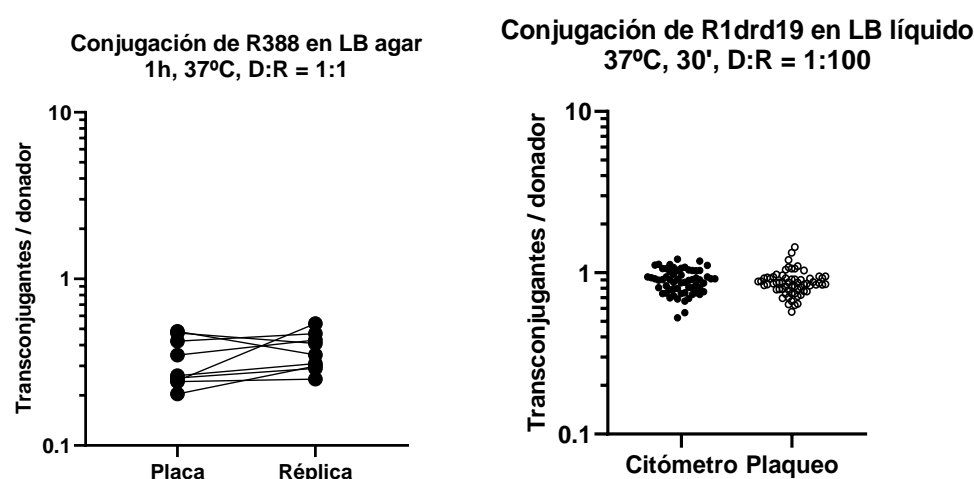


Figura R 8. Efecto del método de conteo sobre las FC finales obtenidas. Conjugaciones de R388 y R1drd19 a 37°C. A) Comparación entre las FC (T/D, eje Y) obtenidas estimando el número de colonias mediante el método de conteo en placa (valores de la izquierda) respecto al método de conteo por réplicas (valores de la derecha). Todos los datos se obtuvieron en conjugaciones de R388 en sólido durante 1h a 37°C en proporciones D:R = 1:1. Cada punto representa el promedio de 3 réplicas técnicas. Las líneas conectan los resultados de cada réplica biológica (3 réplicas técnicas). B) Comparación entre la FC (T/D, eje Y) obtenida mediante el conteo por citometría (izquierda) y el recuento en placa (derecha). Todos los valores corresponden a la conjugación de R1drd19 en LB líquido durante 30' a 37°C sin agitación en proporciones D:R = 1:100

Conteo de colonias usando un citómetro de flujo: Se mide la eficiencia de conjugación en 16 conjugaciones en líquido de una cepa donadora (Rif^R) Bw27783 con pAR119 (R1drd19::YFP) y una cepa receptora (Nx^R) Bw27783:mKate. La conjugación se realiza en LB líquido en proporciones 1:10 de donadores: receptores. Se compara la diferencia entre medir el resultado usando citometría de flujo o el método de plaqueo por gotas.

El coeficiente de variación promedio midiendo poblaciones con el citómetro (tomando tres medidas para cada población en cada mezcla de conjugación) es del **26%** (donadores y receptores) y del **31%** en transconjugantes.

El coeficiente de variación de los logaritmos del cociente Tc/Don, midiendo por citometría de flujo, es del **120%** (n=16).

Se decide optar por el plaqueo en medio selectivo con gotitas, dado que presenta menos fluctuación en el cociente Transconjugantes/Donadores que el protocolo descrito en R1.1, es mucho más rápido y cómodo que el sistema de réplicas (sin pérdida sensible de información) y no requiere la inserción de genes marcadores fluorescentes en nuestras construcciones, a diferencia de la lectura por citometría (sin incrementar con ello tampoco la dispersión en la medida).

1.3 Protocolo de conjugación optimizado

El protocolo de conjugación que se empleó en adelante (salvo que se especifique lo contrario) fue:

Preparación de las placas de 24 o 96 pocillos: Verter 1 ml de LB agar fundido (0.15 ml para las placas de 96p) en los pocillos externos de la placa y dejar secar dos o más días antes de utilizar. Alternativamente, emplear todos los pocillos y dejar secar durante cinco días.

Día antes del ensayo: Inóculo desde colonia puntual o desde glicerol de las cepas de donadores (D) y receptores (R) en matraces conteniendo 10 ml de LB con selección por antibiótico y, para ensayos de sobreexpresión, glucosa al 0.5%. Incubación 15-18 horas a 37°C con agitación (120 rpm).

Día del ensayo: Centrifugación de ambos cultivos 10' a 4000rpm. Resuspensión del pellet en LB fresco sin antibiótico. Incubación 3 horas a 37°C con agitación (120 rpm).

Centrifugación (10' a 4000rpm). Resuspensión del pellet con 1 ml de LB fresco. Pasar a un Eppendorf de 1.5 ml. Añadir 10 µl de la suspensión de donadores en el mililitro de suspensión de receptores. Voltear suavemente el Eppendorf para favorecer la mezcla de D y R. Tomar 15 µl y aplicar sobre la superficie del pocillo de LB agar. Incubar a la temperatura requerida (generalmente 37°C), durante el tiempo necesario, sin agitación.

Levantar la mezcla de conjugación con 1 ml de PBS 1x, vertiendo y recogiendo enérgicamente varias veces para asegurar al máximo la recogida de las colonias pegadas a la superficie.

Diluciones seriadas 1:10 en PBS 1x de la muestra. Plaquear por triplicado 10 µl de cada dilución en la correspondiente placa de LB agar conteniendo los antibióticos necesarios para la selección (por lo general, la selección de antibiótico para receptores también permite el crecimiento de transconjugantes). Incubar 1 día a 37°C y contar las colonias de donadores, receptores + transconjugantes (por lo general se puede aproximar este valor al número de receptores) y transconjugantes.

R2. La conjugación es un proceso dependiente de frecuencia.

Como vimos en la introducción, la propagación de un agente infeccioso en una población puede verse condicionada, de manera general, por dos tipos de dinámicas distintas. Cuando el factor limitante en el proceso de transmisión es el número de encuentros entre individuos portadores e individuos susceptibles de recibir el agente infeccioso, decimos que el proceso está limitado por densidad. Cuando, por el contrario, el factor limitante fundamental se encuentra en el número de eventos de transmisión que puede ejecutar un portador en un tiempo dado, decimos que el proceso está limitado por frecuencia. Desde el trabajo seminal de Levin en 1979 (Levin, Stewart and Rice, 1979) la asunción generalizada en todos los estudios de propagación de plásmidos en poblaciones experimentales es que el proceso está limitado por densidad. Algunos de nuestros resultados preliminares, no obstante, apuntaban a la posibilidad de que, a las densidades de población a las que se estudia la conjugación, nuestro plásmido modelo estuviese limitado en su frecuencia de conjugación. Por esta razón decidimos analizar la dependencia de la conjugación del plásmido en función de la densidad celular.

2.1. Variación en la eficiencia de conjugación alterando las proporciones de donadores y receptores.

En primer lugar, analizamos la dependencia de la frecuencia de conjugación de las proporciones entre donadores y receptores. Para ello, se realizó el protocolo de conjugación de R388 sobre pocillos de LB agar en placas de 24 pocillos añadiendo cantidades crecientes de donadores por cada receptor, manteniendo la misma densidad celular total de 10^9 células/ml. En la figura 9A se presentan los resultados como transconjugantes por receptor en cada experimento.

A continuación, se realizó el mismo experimento, pero empleando cantidades crecientes de receptores por cada donador, manteniendo en todo caso la misma

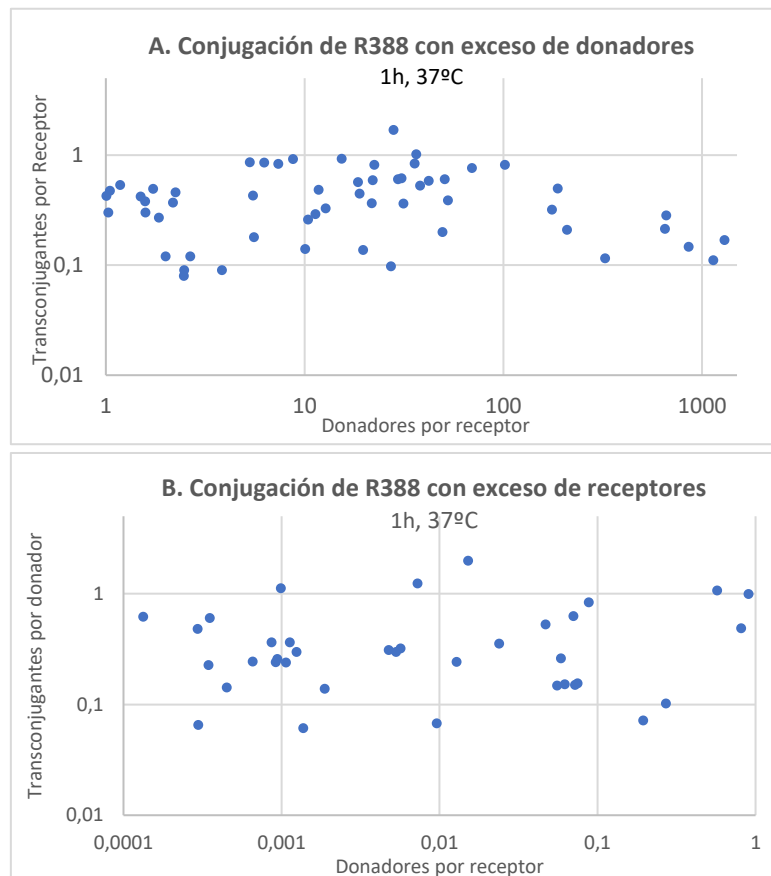


Figura 9. Efecto de la proporción D:R sobre la FC (T/D, eje Y). Conjugación de R388 en sólido 1 hora a 37°C. En el eje x se muestra la proporción de donadores y de receptores. Cada punto corresponde a un experimento de conjugación aislado. En el panel superior se muestran los valores obtenidos cuando la proporción D/R > 1. En el panel inferior, los correspondientes a proporciones D/R < 1.

densidad celular total. En la figura 9B, se representa el número de transconjugantes por cada colonia de donador.

Las frecuencias de conjugación obtenidas indicaron que la eficiencia conjugativa no se ve afectada por la proporción entre D:R, a la densidad celular ensayada.

2.2. Variación en la eficiencia de conjugación con la concentración de la mezcla de conjugación.

Dado que no observamos una relación entre la proporción Donadores: Receptores y la eficiencia de conjugación, se decidió llevar a cabo los siguientes ensayos en proporciones 1:100. De esta manera, si una condición determinada aumentase considerablemente la producción de transconjugantes, la disponibilidad de receptores libres de plásmido no sería un problema.

Posteriormente,

analizamos la dependencia de la frecuencia de conjugación respecto a la densidad celular. Para ello se realizaron ensayos de conjugación con el plásmido R388, tal y como se describen en materiales y métodos, variando la concentración total de la mezcla de D y R.

Para ello, los cultivos de D y R se centrifugaron y resuspendieron en 500 μ l de LB antes de ser mezclados en proporción 1:100. La mezcla fue sometida a una dilución seriada en medio LB y cada una de las diluciones se dejó conjuguar según el protocolo detallado en MyM. Los resultados se muestran en la figura 10. De manera paralela, se realizaron ensayos de movilización del plásmido pSEVA121::oriT-TrwABC. Este plásmido codifica para la región MOB y el

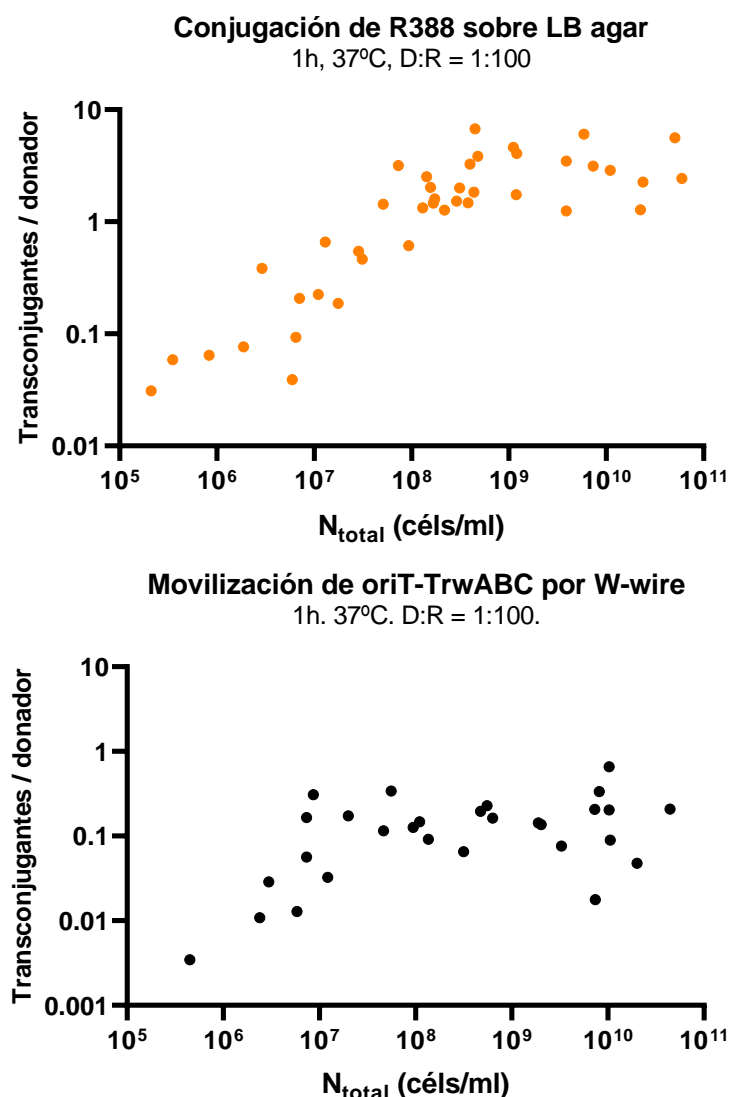


Figura R 10. Efecto de la densidad total de células sobre la FC. En el panel superior, se muestran resultados correspondientes a la conjugación del plásmido R388 wt. En el panel inferior, se muestran los resultados obtenidos en movilizaciones mediante el sistema W-wire + pSEVA121::oriT-TrwABC. En ambos casos las conjugaciones se realizaron en sólido, 1 hora a 37°C en proporciones D:R = 1:100. En el eje Y se muestra la FC (T/D), en el eje X la densidad total de células, en cels/ml. Cada punto representa el promedio de tres réplicas técnicas.

oriT del plásmido natural R388 y, como se describe en la introducción, puede ser transferido por conjugación por donadoras que co-expresen el pilus de R388 (W-wire). La diferencia fundamental entre los ensayos de conjugación con el plásmido R388 natural, y la movilización por el W-wire es que, en el primer caso, el plásmido puede transferirse desde los transconjugantes hacia nuevos receptores. En el caso de la movilización, dado que los transconjugantes carecen del W-wire, tan solo los donadores originales son capaces de transmitir el plásmido. En la figura 10 se muestran las frecuencias de conjugación y de movilización obtenidas para el plásmido natural y para el W-wire a medida que se incrementa la concentración total de células en la mezcla conjugativa. Como puede observarse, a concentraciones por debajo de 10^8 ufc/ml la frecuencia de conjugación de R388 es significativamente menor. Para la movilización por el W-wire, se observa un descenso en la frecuencia de conjugación a concentraciones por debajo de 10^7 ufc/ml. Estos resultados sugieren que, a densidades superiores a las indicadas, ambos procesos están limitados por frecuencia. Llamaremos a las densidades señaladas como “densidad de transición” entre un modelo y otro (ver Figura I9).

Como ya se vio en la introducción, en un proceso dependiente de frecuencia el número de transconjugantes es proporcional al número total de células. Por el contrario, en un proceso dependiente de densidad el número de transconjugantes obtenido depende del producto entre donadores y receptores, por lo que aumenta de forma cuadrática con la densidad total. Transformamos los valores de densidad de transconjugantes ($[Tc]$ de aquí en adelante), y densidad total de células en la mezcla ($[N]$), los normalizamos, (dividiendo cada valor de cada experimento por el mayor valor de $[Tc]$ o de $[N]$) y representamos los logaritmos en base 10 de cada valor normalizado. Para procesos dependientes de frecuencia, los puntos en las gráficas deberían formar una recta de pendiente $m=1$ (relación lineal $[Tc]-[N]$), mientras que para procesos dependientes de densidad esperamos ver rectas con pendiente $m=2$ (relación $[Tc] \sim [N]^2$). Como se muestra en la figura R11, tanto la conjugación de R388 como la movilización por el W-wire se ajustan a un modelo de transmisión limitado por frecuencia ($m=1$) para concentraciones superiores a las densidades de transición.

Al objeto de determinar si esta tendencia era observable también en otros plásmidos conjugativos, se realizó el mismo experimento utilizando los plásmidos naturales pKM101 (IncN), RP4 (IncP1 α), R7K (IncW), pOX38 (IncF-II). Cada uno de estos plásmidos representa un prototipo de los grupos de incompatibilidad mejor estudiados en enterobacterias. Los resultados de estos experimentos se muestran en la figura R11. Como puede observarse en la figura, en todos los casos se observó una densidad de transición a partir de la cual la transferencia pasa a ser dependiente de frecuencia. Dado que en todos los casos (a muy baja densidad) se puede observar un rango de concentraciones en los que la transmisión es fundamentalmente dependiente de densidad ($m=2$), las densidades de transición pueden estimarse a partir del punto en el que se intersectan las rectas de regresión para cada uno de los modelos.

Este punto indica la densidad crítica de receptores a partir de la cual, aunque siga aumentando la N_{total} , la eficiencia de conjugación no aumenta y se dice que el proceso está auto-limitado o saturado. El radio de saturación sería así la mitad de la distancia media entre dos células a esa densidad. En la tabla R1 se indican los valores de transición para los plásmidos analizados.

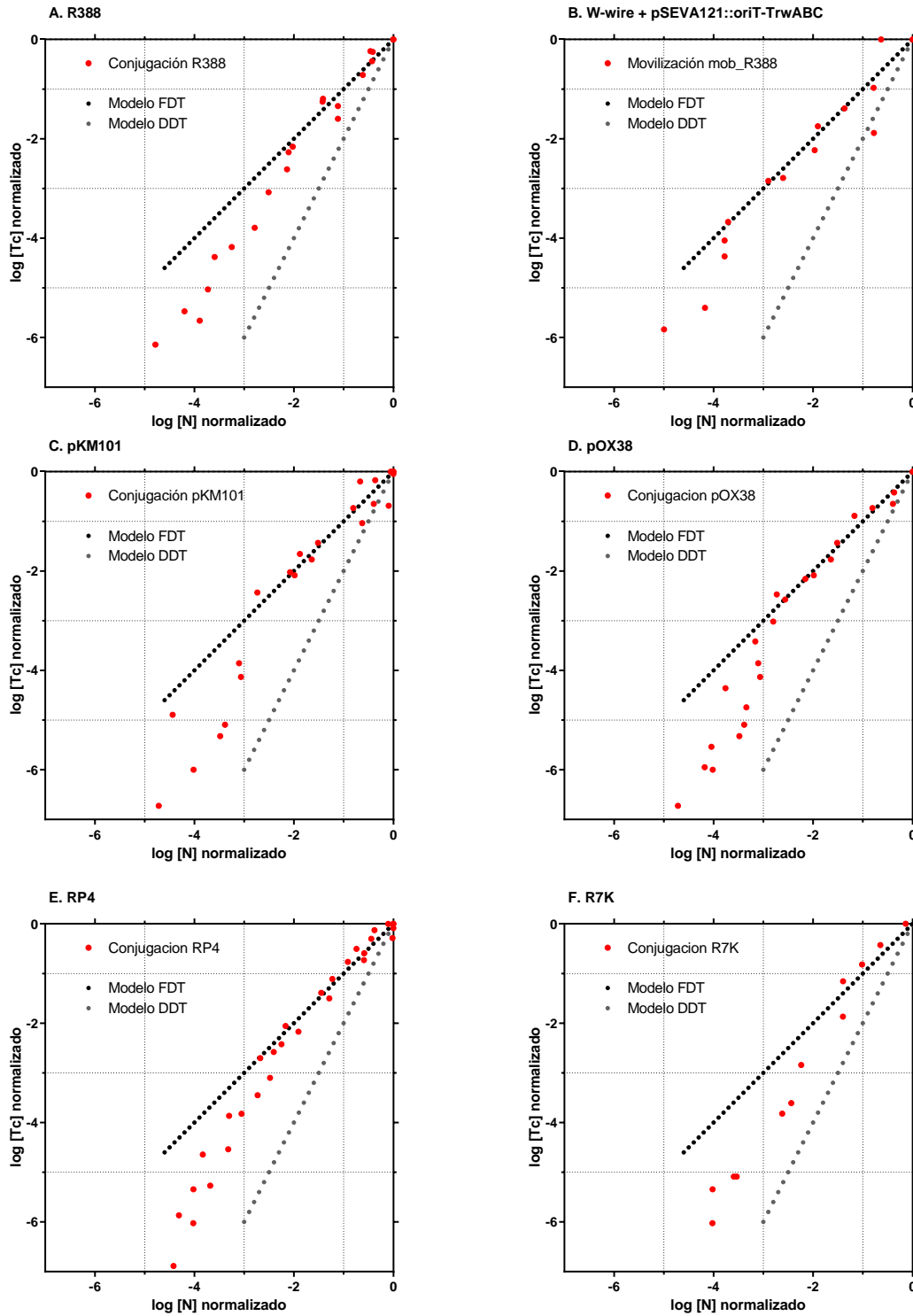


Figura R 11. Transición DDT /FDT para la conjugación de distintos plásmidos. En el eje Y se indica el Log(T) normalizado por el Log(T) obtenido a densidad celular máxima (10^{10} cels/ml). En el eje x se muestra el valor Log(N), donde N es la densidad celular. Los valores fueron normalizados por el Log(N) máximo analizado (10^{10} cels/ml). Todas las. Los puntos negros son los valores esperables si la conjugación siguiese un modelo dependiente de frecuencia (FDT), los puntos grises son los valores esperables si la conjugación siguiese un modelo dependiente de densidad (DDT), los puntos rojos corresponden al valor experimental obtenido en conjugaciones de A) R388, B) movilización con el W-wire, C) pKM101, D) pOX38, E) RP4 y F) R7K.

Tabla R 1. Valores de transición entre DDT y FDT para distintos plásmidos conjugativos.

Plásmido	Transición ($\log[N]_{\text{norm}}$)	m_1 (1)	m_2 (2)	R^2 (3)	Densidad real (células/ μm^2) (4)	Radio saturación (μm) (5)
R388	-1,8	1,53	1,11	0,99	0,093	1,85
W-wire	-3,3	1,59	0,99	0,95	0,004	8,49
R7K	-1.0	1.69	1.04	0.99	0,001	15,8
pKM101	-2,5	1,91	1,05	0,96	0,012	5,22
RP4	-2,5	1,94	1,09	0,98	0,026	3,53
pOX38	-2,7	2,14	0,98	0,98	0,008	6,48

- (1) Pendiente de la regresión lineal del número de T (Figura R10) a bajas densidades celulares.
- (2) Pendiente de la regresión lineal del número de T (Figura R10) a altas densidades celulares.
- (3) Valor de R^2 promedio de las dos regresiones lineales.
- (4) Logaritmo de la densidad celular total observado en la transición DDT/FDT.
- (5) Densidad celular total en la transición DDT/FDT.
- (6) Distancia promedio entre dos células estimada a la densidad de transición.

En conjunto, los resultados mostraron que en el caso de nuestro plásmido modelo existe una limitación de la propagación del plásmido natural a concentraciones celulares superiores a 10^5 cels/ mm^2 o 4000 cels/ mm^2 para las movilizaciones realizadas por el w-wire. Esta limitación hace que el número total de transconjugantes en cada paso de computación producido por cada donador sea significativamente inferior a 1 (promedio 0.16 T/D con sd 0.1), a pesar de que existen múltiples receptores disponibles para cada célula donadora (1D:100R). Esta dependencia de frecuencia es relevante desde el punto de vista fisiológico, ya que limitaría la propagación del plásmido en los ambientes en los que la densidad celular es superior a la densidad de saturación, como por ejemplo los biofilms bacterianos o el lumen del intestino grueso humano. Además, si queremos utilizar la conjugación como base para computación celular, una limitación por frecuencia impone un límite superior en la transmisión de la señal en cada paso conjugativo, dado que una proporción de las células nunca llega a mandar el mensaje. Se hizo necesario, por tanto, intentar estrategias para conseguir que esta limitación por frecuencia se situase por encima de 1 transconjugante por donador. De esta manera podríamos evitar la pérdida de señal en cada paso conjugativo.

R3. Factores limitantes en la conjugación de R388

Los resultados en R2 nos indican que la conjugación de nuestro plásmido modelo R388 (y de otros plásmidos relacionados con el mismo) está limitada intrínsecamente. Esto quiere decir que el proceso no depende de la disponibilidad de donadores y receptores ni de otros factores externos, sino que existe algún factor limitante propio del plásmido o de las células donadoras. Para intentar identificar los factores que limitan la propagación de R388 (y eventualmente superarlos), realizamos un análisis sistemático de su transferencia conjugativa en distintas condiciones.

3.1. Caracterización de la conjugación de R388 y la movilización por la cepa del cable a distintos tiempos.

La limitación por frecuencia de un agente infeccioso puede interpretarse de dos maneras fundamentales. Una posible causa de esta limitación podría residir en que un porcentaje de los donadores no fuese capaz de transmitir el plásmido. Otra posible causa es que el proceso de transmisión requiera cierto tiempo de ejecución con una distribución estadística dada, y que un porcentaje de la población no sea capaz de realizar la transmisión a tiempo. Aunque conceptualmente diferentes, ambas posibilidades arrojarían una limitación semejante, por lo que decidimos analizar en primer lugar el papel del tiempo en la limitación de la conjugación.

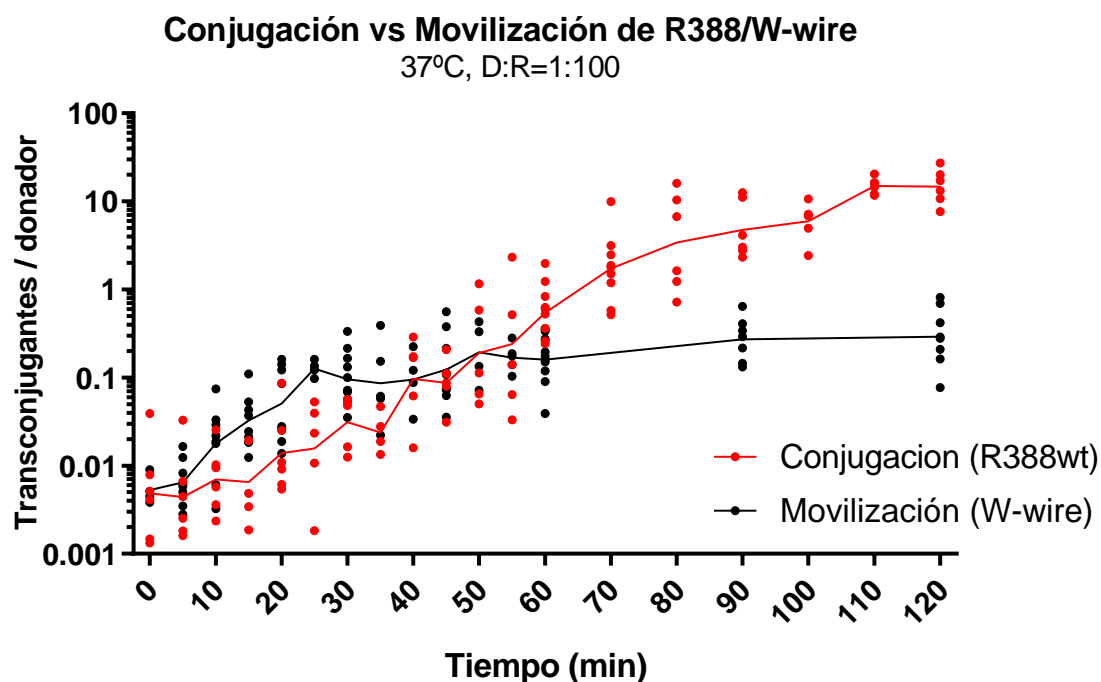
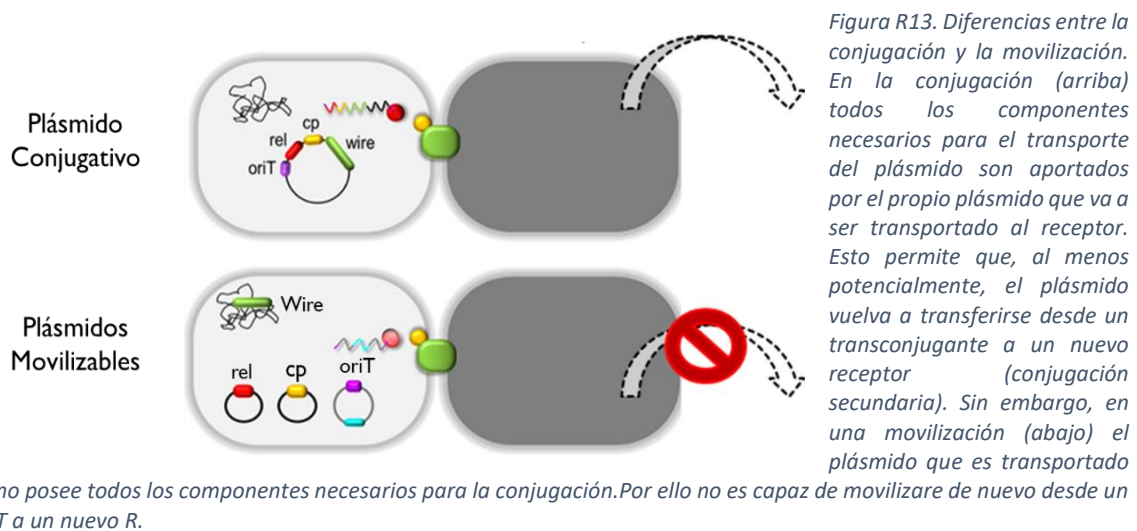


Figura R 12. Comparación entre la cinética de conjugación de R388 (rojo) y la cinética de movilización por el w-wire (negro). Experimentos realizados en sólido a 37°, y proporciones D:R = 1:100. En el eje y se representa la FC (T/D), cada punto es el promedio de tres réplicas técnicas. En el eje x se representa el tiempo (en minutos) que ha estado la mezcla de conjugación sobre el pocillo antes de ser levantado con PBS 1x (el punto 0 indica que se recogió la mezcla de conjugación antes de que se llegara a secar la gota sobre el LB agar. Las líneas unen las medias geométricas de los experimentos a un tiempo t.

Se realizó el protocolo de conjugación habitual usando como cepas donadora y receptora Bw27783 (Nx^R y Rif^R respectivamente) en proporción 1:100. Se detuvo la conjugación levantando la mezcla del pocillo con una solución de PBS a distintos tiempos y se calculó la proporción

Tc/Don obtenidos. En la figura R12 se muestra el progreso de Tc/D obtenidos a distintos tiempos de conjugación, tanto para la conjugación del plásmido natural (en rojo en la figura), como para la movilización por el W-wire (en negro en la figura).

Cuando se comparan las eficiencias de conjugación del plásmido natural R388 y de movilización por el W-wire a lo largo del tiempo se observa al comienzo una cantidad similar de transconjugantes producidos por cada donador en ambos casos. Sin embargo, la conjugación continúa aumentando dicha proporción mientras que en la movilización parece que la proporción de transconjugantes por donador se mantiene constante (y muy por debajo de 1 transconjugante por donador) desde los primeros 30 minutos. Esto significa que, aunque el plásmido natural es capaz aparentemente de invadir una población dado el tiempo suficiente, la movilización por el W-wire no es incapaz de hacerlo. Una posible explicación para esta diferencia fundamental podría residir en el hecho de que el plásmido conjugativo es capaz de conjugarse de manera secundaria, esto es, desde los transconjugantes hacia nuevos receptores. En cambio, como se ha indicado anteriormente, en el caso de la movilización los transconjugantes no son capaces de actuar como donadores (dado que carecen del W-wire). Para comprobar este extremo, decidimos analizar si la conjugación primaria de R388 seguía una tendencia similar a la movilización por el w-wire.



3.2. Determinación de la conjugación primaria del plásmido R388 distintos tiempos.

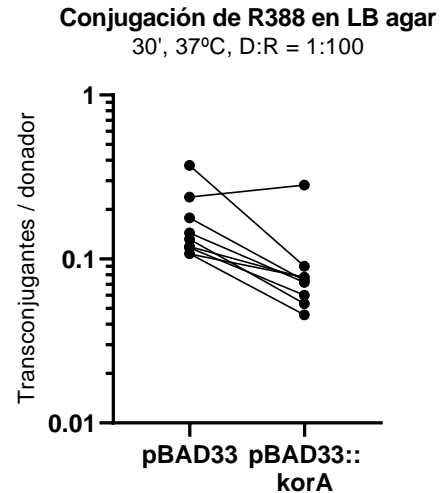
Para comprobar si esta diferencia observada en **3.1.** se debía a la falta de conjugación secundaria (conjugación realizada desde los transconjugantes) en el proceso de movilización, o si se debía a un defecto en la conjugación provocado al insertar la región mpf en el cromosoma de *E.coli*, se realizó un experimento en que R388 tuviese bloqueada la conjugación secundaria.

Para ello se emplearon cepas Bw27783 (Nx^R y Rif^R) como donadores y receptores, llevando los primeros (donadores) el plásmido natural R388 y los segundos (receptores) la construcción pBAD33::pifC o pBAD33::korA alternativamente.

En ambos casos, los genes insertados en el vector pBAD33 se ha descrito que bloquean la conjugación de R388, el primero inhibiendo la proteína acopladora TrwB y el segundo silenciando la expresión de un operón de la región mpf que comprende los genes *korA*, *trwL*, *trwM*, *trwK*, *trwJ*, *eex* y *trwI*. (Fernández-López *et al.*, 2006; Getino *et al.*, 2017). Ambas

estrategias impiden la actuación de la maquinaria conjugativa en los transconjugantes, por lo que bloquean de manera específica la conjugación secundaria (el efecto de pBAD33::pifC sobre los donadores se puede ver en Getino 2017, reduciendo la FC 1000 veces, el efecto de pBAD33::korA en la figura R14a).

Figura R14a. Efecto de la sobreexpresión de korA sobre la conjugación de R388. Experimentos de conjugación de R388 realizados durante 30' a 37°C en proporciones D:R 1:100. En el eje Y se muestran las FC (T/D), y en el eje X la comparación entre las conjugaciones portando el vector de expresión vacío o expresando korA de forma basal (sin inducir con arabinosa). Cada punto es el promedio de tres réplicas técnicas. Las líneas unen experimentos pareados. El descenso promedio en la FC cuando se expresa korA fue del 50%.



Se crecieron las cepas a 37°C en LB con antibióticos y glucosa al 0.5% durante toda la noche. Se lavaron y se dejaron crecer de nuevo 3 horas en LB fresco sin antibiótico y con glucosa (0.5%) o con arabinosa (50 µM) para sobreexpresar los genes *pifC* o *korA*. Se llevó a cabo el proceso de conjugación habitual, salvo porque los pocillos de LB agar contenían también glucosa o arabinosa respectivamente, para asegurar la expresión continuada de los genes bloqueantes.

Se midió la eficiencia de conjugación a distintos tiempos. En la figura R14b se representan los transconjugantes por donador formados a distintos tiempos de conjugación para el sistema sin bloqueo (con conjugación secundaria) y para los sistemas bloqueados por *pifC* y por *korA*. Como referencia se incluyen los valores obtenidos para la movilización con el w-wire.

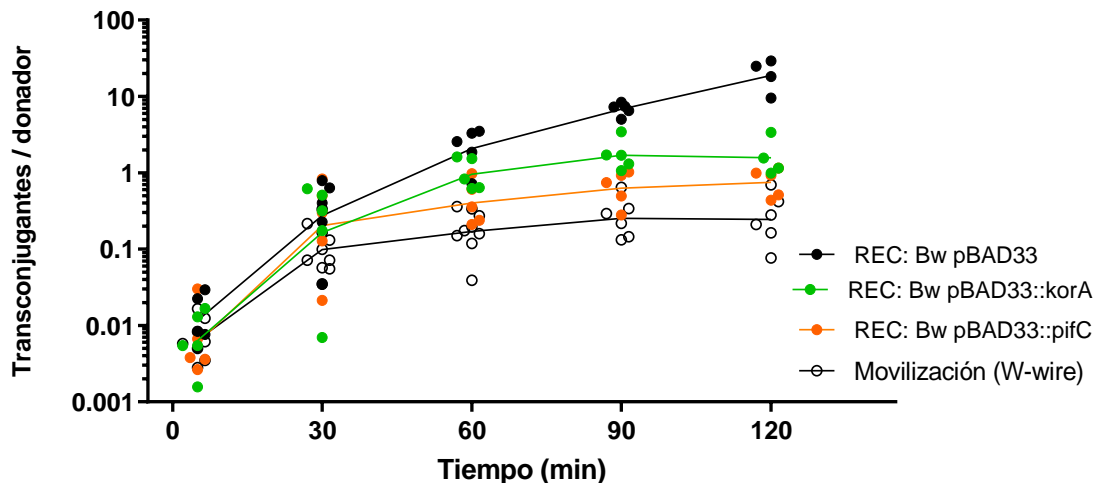


Figura R 13b. Efecto del bloqueo de la conjugación secundaria sobre la propagación de R388. Conjugación de R388 y movilización del pSEVA121::oriT-TrwABC por la cepa W-wire. Experimentos de conjugación a 37°C, proporciones D:R = 1:100. Se representan en el eje y la FC (T/D). En el eje x se representa el tiempo que transcurrió desde que se puso la mezcla de conjugación en la placa de LB agar hasta que se recogió con PBS. Cada punto representa el promedio de tres réplicas técnicas de un experimento de conjugación o movilización. Los círculos negros, indican conjugaciones a receptores que no bloqueaban la conjugación secundaria (conteniendo el plásmido pBAD33 vacío). Los círculos verdes corresponden a receptores en los que la conjugación secundaria se bloqueó mediante la presencia del plásmido pBAD33::korA. En los círculos naranjas, pBAD:pifC bloqueaba la conjugación secundaria del plásmido. Como referencia, se incluyen los valores de movilización por el w-wire, que por definición es incapaz de realizar la conjugación secundaria.

Se observa un incremento paralelo en la producción de transconjugantes en los tres casos durante la primera hora de conjugación, tanto si los receptores portan inhibidores de la conjugación secundaria, como si no lo hacen.

A partir de una hora se aprecia una diferencia significativa entre los receptores control (que llevan un vector pBAD33 vacío), y los receptores que portan vectores codificando para *korA* o *pifC*. De estos dos, el efecto más importante lo muestran los receptores portando *pifC*. Estos resultados concuerdan con la capacidad de reprimir la conjugación de cada factor, que es mayor (1000 veces) en el caso de *pifC* (Getino *et al.*, 2017). El número de transconjugantes por donador en el experimento control aumenta de manera constante, mientras que en los otros dos casos la proporción T/D alcanza un máximo de entre 0.2 y 0.9 para *pifC* y de 0.6 y 3.3 T/D para *korA*. Comparando los resultados reprimiendo con *pifC* con los obtenidos para la movilización por el W-wire, no se observan diferencias estadísticamente significativas. Esto sugiere que la movilización produce FC inferiores debido a que no puede producirse conjugación secundaria desde los transconjugantes.

3.3. Cinéticas de movilización empleando receptores competentes para la movilización.

Dado que hemos comprobado que tener limitada la movilización a solo el primer paso donador-receptor reduce la eficiencia del proceso conjugativo poderosamente, se diseñó un experimento en el que los receptores poseyeran también el cable insertado en el cromosoma y se midieron las eficiencias de movilización a lo largo del tiempo. De esta manera, esperábamos que los transconjugantes formados actuaran como nuevos donadores, tal y como sucede en la conjugación del plásmido natural. El protocolo de conjugación es el habitual, solo cambiando la cepa de receptores: de Bw27783 (Rif^R) a MDS42:W-wire (Rif^R).

Los resultados mostrados en la figura R15 A, sin embargo, arrojan unas eficiencias de conjugación unas 50 veces más bajas que las habituales con receptores sin el W-wire. Esto se debe a que, como la cepa de receptores empleada tiene la región *mpf* completa, también expresa el gen de exclusión de entrada (*eex*). Este gen hace que las células que contienen el plásmido no sean susceptibles de volver a recibirlo por conjugación (Garcillán-Barcia and de la Cruz, 2008), por lo que en condiciones naturales evita rondas redundantes de conjugación entre cepas portadoras del plásmido. Por tanto, repetimos el experimento empleando como receptora una cepa del cable con una inserción que bloqueaba la expresión de dicho gen:

Los resultados, mostrados en la figura R15 B, indicaron sin embargo que esta estrategia no consiguió generar dinámicas de movilización que tuviesen la misma eficiencia que la conjugación del plásmido natural. La frecuencia de movilización desde cepas que portaban el w-wire Δeex fue 8-10 veces más baja que en el caso del cable intacto (resultados no mostrados). Esto hizo que la contribución de la conjugación secundaria fuese mucho más reducida que la observada en la conjugación natural. Las razones por las que el w-wire Δeex conjuga mucho peor que el wt no están claras. Es posible que la delección genere efectos polares sobre la expresión de genes *tra* situados aguas abajo. Otra posibilidad es que el pilus conjugativo necesite de la presencia del gen *eex* para su correcto funcionamiento. En cualquier caso, estos resultados indicaron que no es posible reproducir el efecto de la conjugación secundaria introduciendo el W-wire en los receptores. Es necesario por tanto buscar estrategias para alcanzar frecuencias de movilización suficientemente altas para compensar la pérdida de la conjugación secundaria.

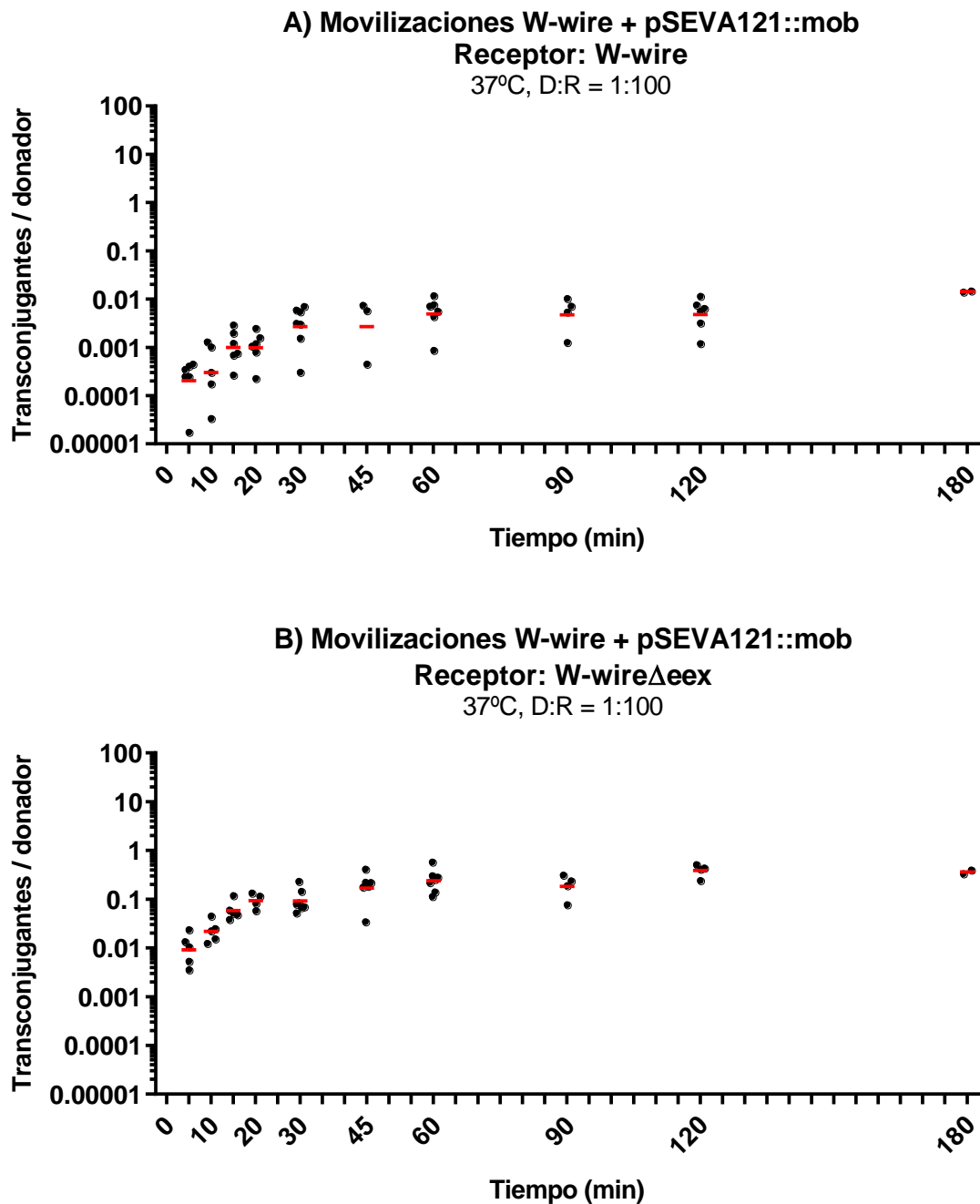


Figura R 14. Efecto de la presencia del W-Wire en los receptores sobre la frecuencia de movilización. Movilizaciones del pSEVA121::oriT-TrwABC por el W-wire a cepas W-wire (A) y W-wire Δ eex (B) a 37°C, tiempos variables, proporciones D:R = 1:100. En el eje Y se representa la FC (T/D). En el eje X, el tiempo transcurrido desde que se puso la mezcla de conjugación en la placa de LB agar hasta que se recogió con PBS. Cada punto representa el promedio de tres réplicas técnicas de un experimento de conjugación o movilización.

3.4. Efecto de la sobreexpresión de genes y operones esenciales en la conjugación.

Un posible factor limitante en la conjugación era que la expresión de alguno de los genes u operones implicados en la conjugación fuera insuficiente. Sabíamos que la estequiometría de los componentes del sistema de secreción está finamente ajustada (Low *et al.*, 2014) y sometida a un sistema de auto-represión tanto en R388 (Fernández-López *et al.*, 2006) como en otros

plásmidos altamente conjugativos de amplio rango de hospedador como los IncP y los IncN (ver sección 1.6.3. de la Introducción). De hecho, en la bibliografía (Bolland *et al.*, 1990) se describe un clon de la región *tra* de R388 en un vector de expresión bajo el control del promotor Plac que aumenta la eficiencia de conjugación cuando es inducido y, sin embargo, cuando la región es insertada en sentido contrario el efecto se pierde. Esto nos hizo pensar que uno de los componentes del sistema conjugativo podría estar infraproducido, limitando la capacidad o alargando el tiempo de montaje del T4SS. En el caso de R388 la maquinaria conjugativa se transcribe en tres operones (Figuras I5 e I6 de la Introducción). El primero de ellos contiene la región *mob* y los genes *trwABC*. La región *tra* se organiza en dos operones (*trwHGFED* y *trwMKJI*).

Para comprobar si la expresión de alguno de estos operones era limitante, se insertaron por separado en el vector de expresión pBAD33 mediante ensamblaje Gibson y se introdujeron estas construcciones en cepas DH5 α (se emplea esta cepa porque es *recA*⁻ ya que de lo contrario una secuencia homóloga tan larga podría permitir una recombinación entre el vector y el plásmido R388) junto con el plásmido R388 natural. Se empleó la cepa Bw27783 (Rif^R) como receptor de la conjugación. La expresión por el vector fue silenciada (preincubando con glucosa 0.5%) o activada (preincubando con arabinosa 50 μ M).

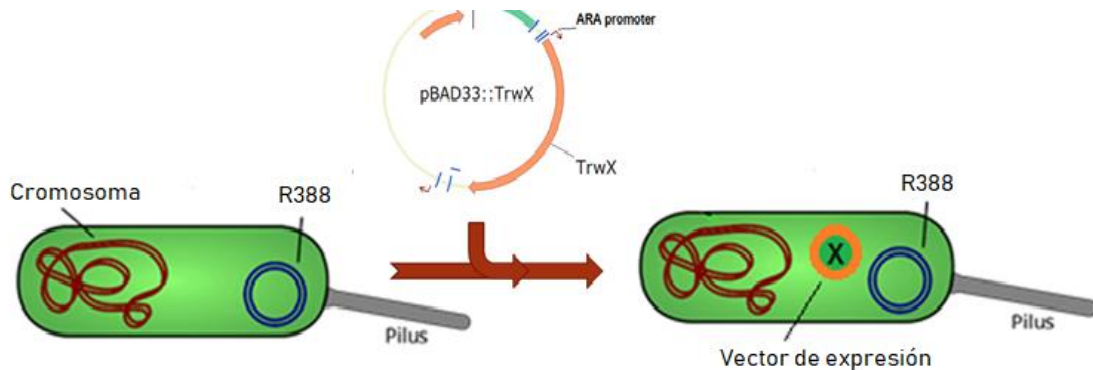


Figura R 15. Representación esquemática de la suplementación de genes y operones implicados en la conjugación de R388 (en azul) mediante el vector de expresión pBAD33 (en naranja).

A continuación, se midió la frecuencia de conjugación del plásmido cuando se sobreexpresaba cada uno de estos operones. En la figura R16A se representa la eficiencia de conjugación relativa de cada donador con R388 suplementado con un operón con respecto a la eficiencia de un donador con R388 + pBAD33 vacío. Cada punto corresponde a un experimento independiente.

Eficiencia de conjugación relativa al control R388 + pBAD33:

- pBAD33::TrwABC = 1.2x (n=10)
- pBAD33::TrwHGFED = 1.7x (n=30)
- pBAD33::TrwMKJI = 2.7x (n=30)
- pBAD33::korA-TrwLMKJI = 0.5x (n=20).

Dado que se observaba un aumento en la eficiencia de conjugación con algunas de estas construcciones (pBAD33::TrwHGFED y pBAD33::TrwMKJI) se sospechó que efectivamente había algún o algunos genes actuando como factores limitantes en la construcción del sistema de secreción. Por ello se repitió el proceso anterior, pero esta vez insertando en el vector de expresión pBAD33 cada uno de los genes por separado (salvo los genes *trwH* y *trwG*, que se clonaron como una fusión transcripcional). A continuación, estudiamos el efecto de su sobreexpresión sobre la conjugación del plásmido R388 (figura R16 B).

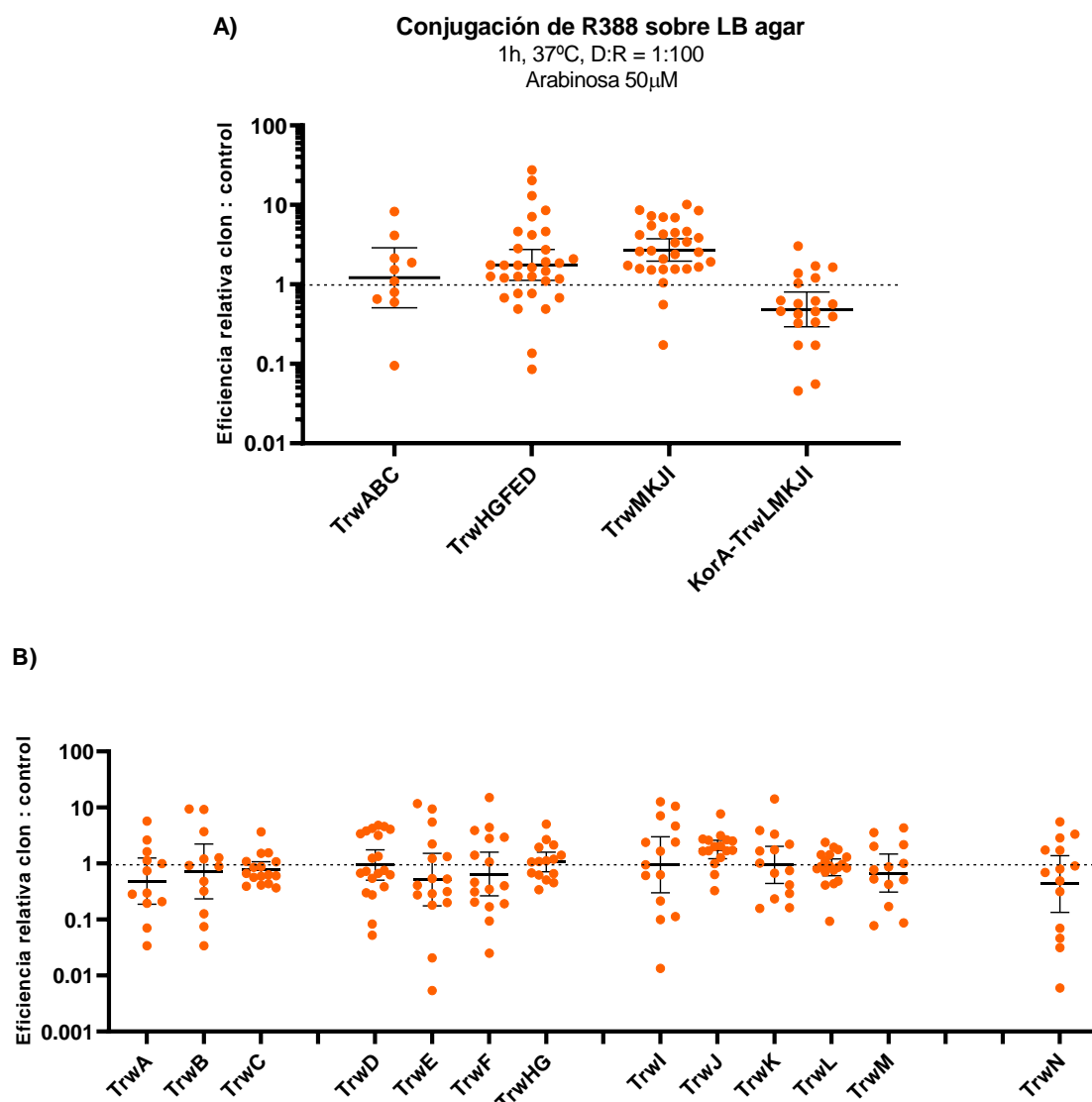


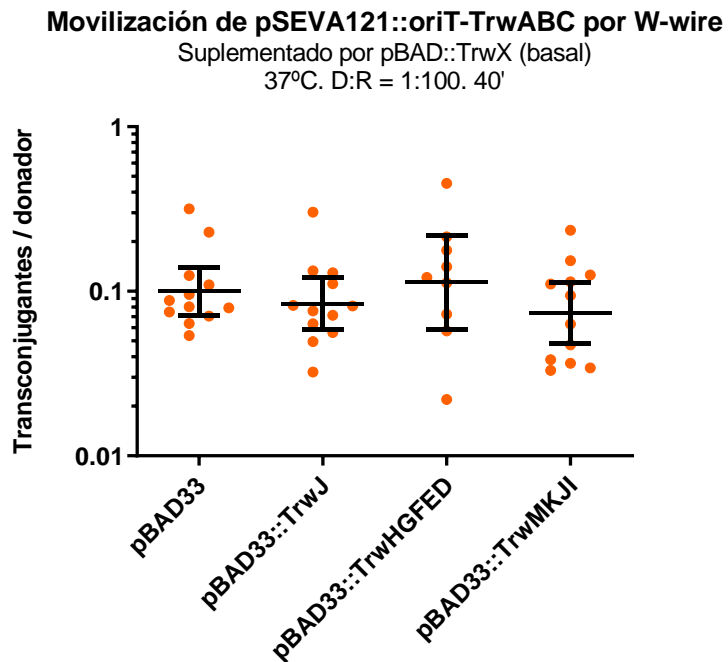
Figura R 16. Efecto de la sobreexpresión de genes y operones conjugativos sobre la FC. Conjugación sobre LB agar de R388 suplementado por varios operones completos (panel superior) o genes individuales (panel inferior), tal y como se describe en la sección R.3.4. Las conjugaciones se realizaron durante 1 hora a 37°C, en proporciones D:R = 1:100. Se representan en el eje y la FC relativa al control conteniendo el vector de expresión vacío (FCs en T/D). En el eje se indica el gen o conjunto de genes insertado en el vector de expresión que son aportados en trans para la conjugación. Cada punto representa el promedio de tres réplicas técnicas. Se representan asimismo las medias geométricas y los intervalos de confianza al 95% para cada experimento. La línea de puntos indica una eficiencia igual entre el control negativo y los donadores suplementados.

Como en el caso anterior, las frecuencias de conjugación obtenidas se relativizaron por las de los controles sin sobreexpresión, por lo que un resultado de 1 indica que la sobreproducción de dicho gen no produce efectos significativos sobre la FC. Como se muestra en la figura R16B, tan solo la sobreexpresión del gen *trwI* produjo diferencia estadísticamente significativa (1.8x, n=16). En el resto de los casos la sobreproducción de los genes no tuvo consecuencias sobre la

FC, o la disminuyó moderadamente. En el caso del gen codificante para la pilina (*trwL*), se observó un efecto tóxico cuando ésta se sobreexpresaba, por lo que los resultados mostrados en la figura corresponden a la FC obtenida cuando los donadores contienen el plásmido pBAD33::*trwL* sin inducir.

A continuación, probamos si el aumento en la FC producido por la sobreexpresión de genes individuales *trwJ* o del operón *trwMKJI* completo permitía obtener frecuencias de movilización por parte del w-wire suficientemente altas. Como se muestra en la figura R17, la sobreexpresión de estos factores no fue suficiente para alcanzar FCs de 1 T/D.

Figura R 17. Efecto de la sobreexpresión de *trwJ* y los operones *TrwHGFED* y *TrwMKJI* sobre la movilización. Movilización sobre LB agar del plásmido pSEVA121::oriT-*TrwABC* por el w-wire, suplementado por las construcciones que produjeron aumentos significativos en la figura R16. Las movilizaciones se realizaron durante 40 minutos a 37°C, en proporciones D:R = 1:100. Se representan en el eje y la FC (en T/D). En el eje x se indican las construcciones aportadas en trans para la conjugación. Cada punto representa el promedio de tres réplicas técnicas. Se representan asimismo las medias geométricas y los intervalos de confianza al 95% para cada experimento.



3.5. Efecto de un aumento en la capacidad de adhesión entre donadores y receptores sobre la eficiencia de conjugación (en líquido y en sólido).

En el plásmido R388 gen *trwJ* codifica para la adhesina, que es la proteína responsable de establecer la adhesión entre el pilus conjugativo y la célula receptora (Yeo *et al.*, 2003; Yuan *et al.*, 2005). Resultados previos con otros plásmidos como pKM101 (Yeo *et al.*, 2003), pB10 (de Gelder, 2008) y pTi (Citovsky, 2011) relacionaban a homólogos de esta proteína con aumentos en la eficiencia de conjugación, apuntando a una relación directa entre la adhesividad donador-receptor y la eficiencia de conjugación. Por estas razones decidimos analizar si la capacidad conjugativa del plásmido venía limitada por la adhesión entre donadores y receptores.

3.5.1. Mutagénesis dirigida de las adhesinas de R388 y pKM101. Las adhesinas TrwJ de R388 y TraC de pKM101 son unas proteínas pequeñas (220 aminoácidos) que se han encontrado unidas a la pilina de sus respectivos T4SS en la base y la punta del pilus y que están implicadas en la adhesión y reconocimiento de los receptores de la conjugación.

Según Yeo 2003 una mutación puntual (V144W) en la adhesina de pKM101 (TraC) producía un incremento muy significativo en la eficiencia de conjugación de dicho plásmido. Dado que habíamos observado un incremento en la eficiencia de conjugación de R388 al sobreexpresar su

Se llevaron a cabo las conjugaciones complementando o suplementando, empleando como control negativo un vector pBAD33 vacío y como control positivo la construcción pBAD33::trwJ. Se incubaron donadores (Dh5α + pBAD33 + R388 (natural o ΔtrwJ) y receptores (Bw27783) en glucosa y tres horas antes se lavaron en LB fresco solo, con glucosa 0.5%, o con arabinosa 50uM.

Para las suplementaciones se llevaron a cabo conjugaciones en sólido durante 1 hora a 37°C en LB agar sólo, con glucosa o con arabinosa. En las siguientes gráficas se presenta la eficiencia de conjugación de los donadores portando R388 y el clon con el gen trwJ natural o mutado con respecto a la eficiencia de conjugación de los donadores portando R388 y el vector pBAD33 vacío.

Conjugación de R388 suplementado por trwJ mutada

1h, 37°C, D:R = 1:100, LB agar + arabinosa 50 μM

Resultados relativos a R388 + pBAD33

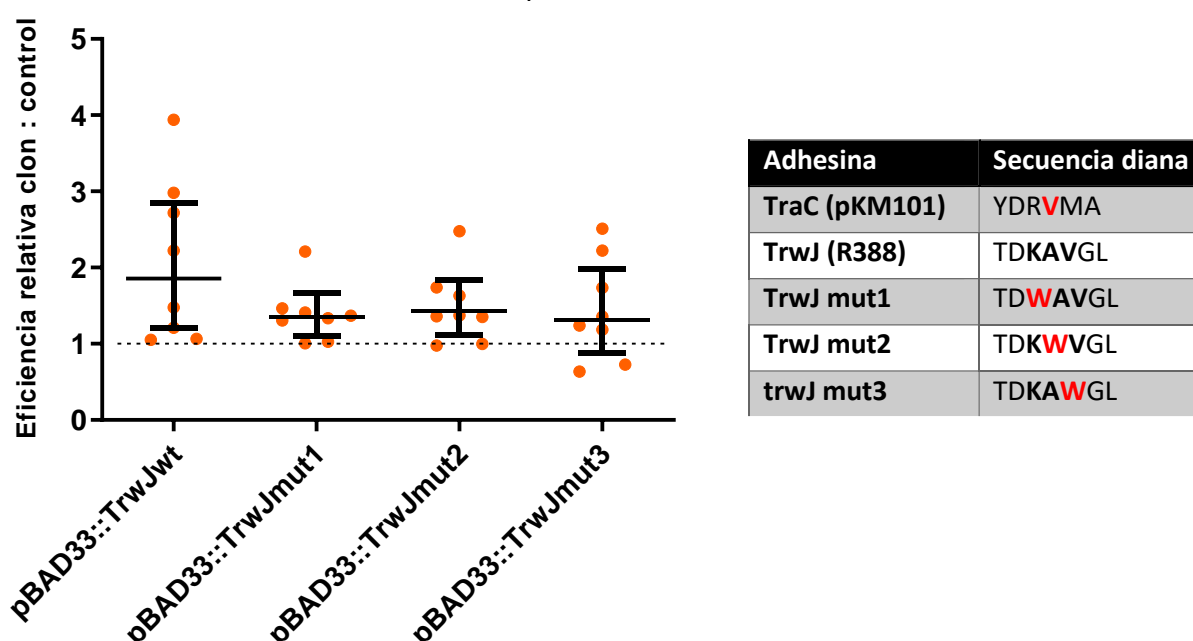


Figura R 20. Efecto de las mutaciones en la adhesina trwJ sobre la FC. Conjugación de R388 sobre LB agar suplementado por las construcciones pBAD33::trwJ natural y mutados, durante 1 hora a 37°C, en proporciones D:R = 1:100. En el panel izquierdo se muestra la FC obtenida para cada mutación. En el eje y, se muestra la FC relativa al control que contenía el vector de expresión vacío. En el eje x se indica la variante del gen trwJ insertado en el vector de expresión y aportado en trans para la conjugación. Cada punto representa el promedio de tres réplicas técnicas. Se representan asimismo las medias geométricas y los intervalos de confianza al 95% para cada experimento. La línea de puntos indica una eficiencia igual entre el control negativo y los donadores suplementados. Derecha: tabla explicativa en la que se indica la secuencia de aminoácidos en la región de interés de las adhesinas TraC de pKM101 y TrwJ de R388 y los tres mutantes puntuales, indicándose en rojo la posición en la que se mutó el aminoácido original, cambiándolo a triptófano (W) por mutagénesis dirigida.

La eficiencia relativa (con respecto a R388 suplementado con un pBAD33 vacío) de conjugación de R388 suplementado por cada uno de los mutantes fue:

- R388 + pBAD33::TrwJ_{wt}: 1.85x
- R388 + pBAD33::TrwJ_{mut1}: 1.35x
- R388 + pBAD33::TrwJ_{mut2}: 1.40x
- R388 + pBAD33::TrwJ_{mut3}: 1.30x

Lo que nos indica que dichos mutantes no mejoran la eficiencia de conjugación significativamente, respecto a la mejora producida por la sobreexpresión de la proteína natural.

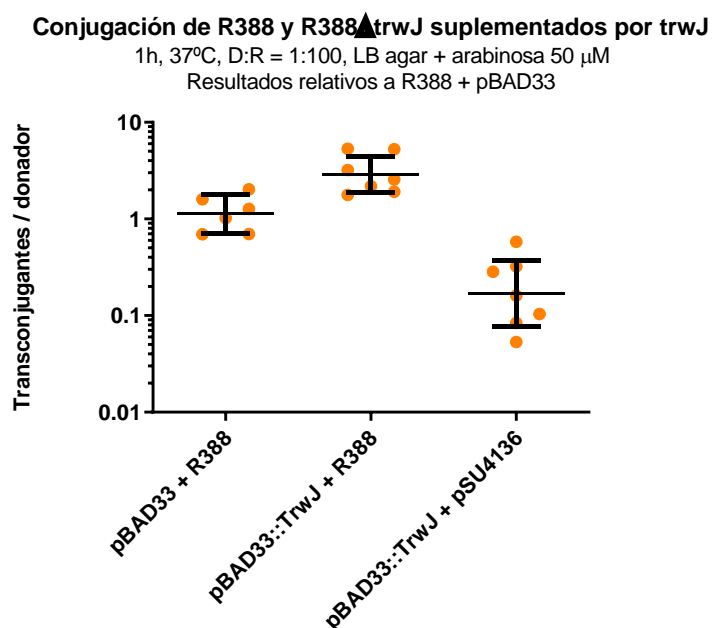


Figura R 21. Efecto de la sobreexpresión de trwJ sobre la FC de un mutante R388 Δ TrwJ. Conjugación durante 1 hora a 37°C, en proporciones D:R = 1:100 de R388 o R388 Δ TrwJ sobre LB agar suplementados por pBAD33 o pBAD33::trwJ. Se representan en el eje de las y la proporción transconjugantes por donador. En el eje de las x se indica cada una de las combinaciones de R388 o R388 Δ TrwJ y pBAD33 o pBAD33::trwJ (la combinación de R388 Δ TrwJ + pBAD33 no produjo ningún transconjugante y no se incluye en la figura). Cada punto representa el promedio de tres réplicas técnicas. Se indican además las medias geométricas totales y el intervalo de confianza al 95%.

De la misma manera hicimos ensayos de complementación empleando las mismas construcciones en pBAD33 pero usando un R388 Δ TrwJ (pSU4136, de Paz 2005).

De nuevo vimos que la suplementación de R388_{wt} con TrwJ mejora significativamente la eficiencia de conjugación. Sin embargo, la complementación del R388 Δ TrwJ con la misma construcción pBAD33::trwJ no consigue recuperar aparentemente la eficiencia del plásmido natural.

La suplementación con TrwJ incrementa sensiblemente la eficiencia de conjugación de R388, sin embargo, la complementación del mutante pSU4136 produce sólo el 20% de transconjugantes por donador que los que produce el plásmido R388 natural.

Esto puede llevar a pensar que la complementación del R388 Δ TrwJ no consigue recuperar la eficiencia de conjugación. En la bibliografía ya había sido descrito (de Paz 2005) y anteriormente también con traC, el homólogo de trwJ en pKM101 (Schmidt 1999). Se llevaron a cabo varios estudios que permitieron descartar un posible efecto polar sobre los genes del entorno de trwJ debido a la inserción del transposón Tn5tac1 (resultados no mostrados). Hay dos posibles explicaciones no excluyentes para esta reducción en la eficiencia de conjugación: la necesidad de expresar organizadamente todos los genes para el montaje del T4SS, tanto a nivel espacial como temporal y que sólo se está observando conjugación “primaria” porque los transconjugantes en este ensayo no pueden actuar como donadores en una nueva ronda de conjugación. De hecho, el número de transconjugantes por donador tras una hora de conjugación fue similar al obtenido en las movilizaciones del pSEVA121::oriT-trwABC con la cepa W-wire.

De la misma manera realizamos el ensayo de suplementación de pKM101 con el vector pBAD33 vacío, con el mismo vector con el gen traC, y con el gen traC(V144W) mutado, midiendo la frecuencia de conjugación en todos los casos.

Conjugación de pKM101 suplementado con traC

1h, 37°C, D:R = 1:100, LB agar ± Arabinosa 50µM

Resultados relativos a pKM101 + pBAD33

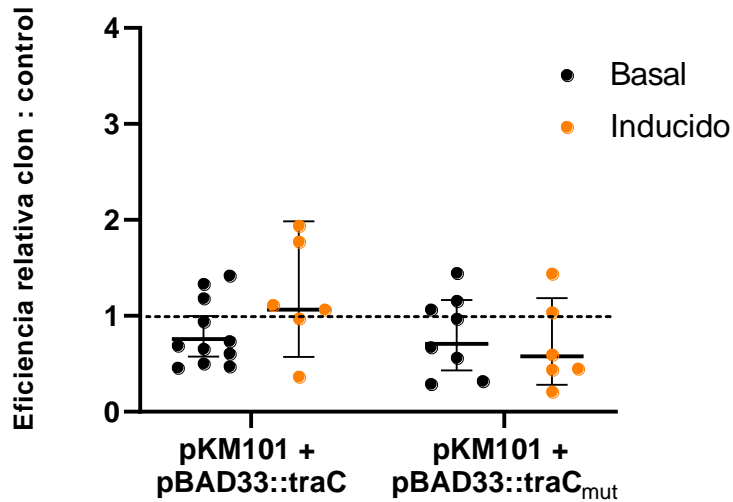


Figura R 22. Efecto de las mutaciones sobre la adhesina en la FC del plásmido pKM101. Conjugación de pKM101 sobre LB agar suplementado por las construcciones pBAD33::traC natural y mutado, durante 1 hora a 37°C, en proporciones D:R = 1:100. Izquierda: Se representan en el eje y la FC relativa a un control conteniendo el vector de expresión vacío. En el eje x se indica el gen traC insertado en el vector de expresión y aportado en trans para la conjugación. Cada punto representa el promedio de tres réplicas técnicas. Se representan asimismo las medias geométricas y los intervalos de confianza al 95% para cada experimento. La línea de puntos indica una eficiencia igual entre el control negativo y los donadores suplementados.

La eficiencia de conjugación relativa (con respecto a pKM101 suplementado con un pBAD33 vacío) de pKM101 suplementado por traC natural y mutada fue:

- pKM101 + pBAD33::TraC_{wt} (basal): 0.75x
- pKM101 + pBAD33::TraC_{wt} (inducido): 1.05x
- pKM101 + pBAD33::TraC_{mut} (basal): 0.70x
- pKM101 + pBAD33::TraC_{mut} (inducido): 0.55x

por lo que podemos concluir que la suplementación de pKM101 con la adhesina mutada V144W no sólo no mejora, sino que empeora la eficiencia de conjugación del plásmido.

Los resultados de la suplementación del plásmido pKM101 con traC (natural o mutado) en trans nos indica:

- que el efecto observado sobre la eficiencia de conjugación al aportar *trwJ* en *trans* a R388 no es extensible a pKM101, dado que ni siquiera induciendo el promotor con arabinosa se obtienen mejores resultados respecto del control.
- que no fue posible replicar los resultados del experimento descrito en Yeo 2003, dado que la suplementación con TraC V144W no mejoró la frecuencia de conjugación. Es posible que el efecto observado por Yeo et al. fuese debido a una disminución de la viabilidad de los donadores debida a la sobreexpresión de la proteína. Dado que la frecuencia de conjugación se expresa como T/D, un descenso en la viabilidad de D se traduce en un incremento artificial en la FC.

3.5.2. Efecto del incremento de la adhesividad entre donadores y receptores sobre la eficiencia de conjugación: Para comprobar si la limitación intrínseca en la eficiencia de conjugación se debía a que el par conjugativo creado entre donadores y receptores era demasiado lábil se empleó un sistema cedido por Marta Robledo, y Luis Angel Fernandez, (Salema 2013). Dicho sistema consta

de dos cepas y está basado en la expresión de dos proteínas de superficie (intimina y receptor de intimina traslocado, *tir*) que se expresa cada una en una cepa, se reconocen mutuamente y establecen entre sí uniones específicas, favoreciendo así la adhesión entre las dos cepas que las expresan.

Una de estas proteínas (un dominio en barril β del gen de la intimina, una proteína extracelular) está expresada constitutivamente en el cromosoma de *E.coli* K-12 (MG1655 Δ fimA-H), esta cepa se denomina EcM1. La otra proteína (el dominio extracelular del receptor de intiminas ó *tir*) está condicionalmente expresada bajo el promotor *lac* en un vector pNVtir. La primera cepa EcM1 actúa como receptora en conjugaciones con R388, que es aportado en la cepa donadora (Bw27783, a la que se le ha transformado previamente la construcción pNV::tir1).

Se llevó a cabo el protocolo habitual de conjugación, reprimiendo la expresión del gen tir cultivando en LB suplementado con glucosa 0,5% durante toda la noche. Posteriormente se indujo con IPTG 100 μ M durante la fase de preincubación (3 horas). La conjugación se realizó tanto en líquido (15 μ l de la mezcla concentrada de conjugación en 1 ml de LB en placa de 24 pocillos, sin agitación) como en sólido (protocolo habitual), durante 1 hora a 37°C. Se realizaron conjugaciones probando las cuatro combinaciones posibles entre donadores con/sin intimina (EcMA/MG1655) y receptores (Bw27783) con/sin receptor de intiminas (pNV::tir1).

Eficiencia de conjugación de R388 en líquido basal/inducida con IPTG 100 μ M (medias

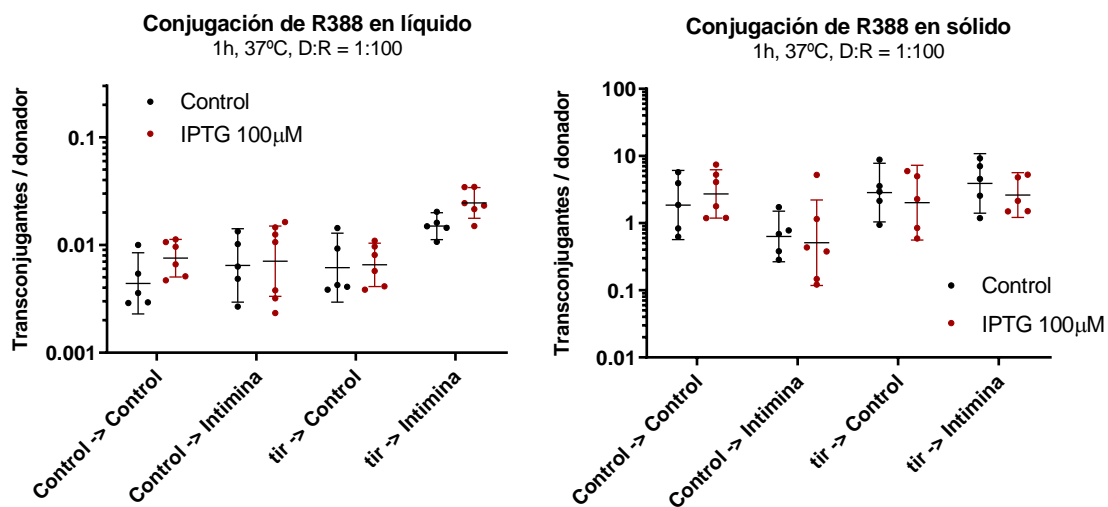


Figura R 23. Efecto de la adhesión sintética mediante el sistema de intiminas sobre la FC. Conjugaciones de R388 a 37°C durante 1 hora en proporciones D:R = 1:100 usando el sistema de adhesión basado en intimina-receptor de intimina en LB líquido (gráfica izquierda) y sobre LB agar (gráfica derecha). En el eje y se representa la proporción de transconjugantes por donador. En el eje x se indica la cepa de donadores -> cepa de receptores, siendo las tres primeras por la izquierda los controles (Control de donadores: MG1655; control de receptores: Bw27783) y solo la cuarta el ensayo con el sistema completo de adhesión (EcMA en donadores, Bw27783 + pNVtir en receptores). Los puntos indican el promedio de tres réplicas técnicas, en rojo aquellos que se han incubado en LB y en rojo los incubados con IPTG para inducir la expresión del vector pNVtir. Se indican además las medias geométricas totales y los intervalos de confianza al 95% para cada condición.

geométricas):

- MG1655->Bw27783: $6 \cdot 10^{-3} \text{ Tc} \cdot \text{Don}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ / $7 \cdot 10^{-3} \text{ Tc} \cdot \text{Don}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$
- MG1655->Bw pNV::tir1: $7 \cdot 10^{-3} \text{ Tc} \cdot \text{Don}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ / $7 \cdot 10^{-3} \text{ Tc} \cdot \text{Don}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$
- EcM1 -> Bw27783: $6 \cdot 10^{-3} \text{ Tc} \cdot \text{Don}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ / $6 \cdot 10^{-3} \text{ Tc} \cdot \text{Don}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$
- EcM1->Bw pNV::tir1: $1.5 \cdot 10^{-2} \text{ Tc} \cdot \text{Don}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ / $2.5 \cdot 10^{-2} \text{ Tc} \cdot \text{Don}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$

Hay una diferencia estadísticamente significativa (comparación de las distribuciones de $\log(Tc/Don)$ control-control con tir-intimina en IPTG; test t Student dos colas, $n=6$, $P=0.0002$) en la eficiencia de conjugación de R388 cuando se emplea el sistema intimina-tir en conjugaciones en líquido.

Eficiencia de conjugación en sólido (LB agar) basal/inducida con IPTG 100 μ M (medias geométricas):

- MG1655->Bw27783: **1.8** Tc*Don⁻¹*h⁻¹ / **3.2** Tc*Don⁻¹*h⁻¹
- MG1655->Bw pNV::tir1: **0.6** Tc*Don⁻¹*h⁻¹ / **0.5** Tc*Don⁻¹*h⁻¹
- EcM1 -> Bw27783: **2.8** Tc*Don⁻¹*h⁻¹ / **2.6** Tc*Don⁻¹*h⁻¹
- EcM1->Bw pNV::tir1: **3.9** Tc*Don⁻¹*h⁻¹ / **3.0** Tc*Don⁻¹*h⁻¹

Aunque existe una diferencia sensible en la eficiencia de conjugación de R388 en líquido cuando se emplea este sistema de adhesión donadores-receptores, dicho efecto no es detectable en conjugaciones en sólido. Por lo tanto, este método de incrementar la eficiencia de conjugación no es útil para el montaje de nuestro sistema Plasmwires.

3.6. Efecto del número de copias del plásmido en la eficiencia de conjugación.

Datos previos de nuestro laboratorio apuntaban a que un factor importante en la eficiencia conjugativa era la disponibilidad de copias de plásmido asociadas a los pilus conjugativos. Mediante estudios de microscopia de fluorescencia, Guynet et al. observaron que algunas copias del plásmido se asocian a la membrana. La asociación del DNA plasmídico al pilus parece estar mediada por la proteína StbB, que controla el balance entre las copias citoplasmáticas y las copias asociadas al canal conjugativo (Guynet *et al.*, 2011). Dado que estos resultados sugerían un papel limitante en la disponibilidad de copias de plásmido asociadas a la membrana, decidimos analizar si alguno de estos factores podía asociarse a la FC. En primer lugar, analizamos si un mayor número de plásmidos disponibles permitiría un mayor número de eventos conjugativos se midió la eficiencia de conjugación del plásmido natural R388 (1-3 copias por célula) frente a la de un derivado pSU1027, que posee un replicón p15a de mayor número de copias (~10 copias por célula) (Bolland *et al.*, 1990).

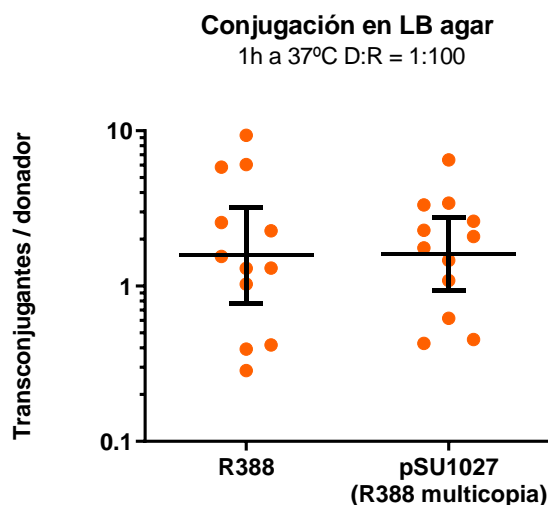


Figura R 24. Efecto del número de copias del plásmido sobre la FC. Conjugación de R388 y pSU1027 durante 1 hora sobre LB agar a 37°C en proporciones D:R = 1:100. En el eje *as* y se representa la FC (T/D), en el eje *x* se indica el plásmido que portan los donadores. Cada punto representa el promedio de tres réplicas técnicas. Se incluyen las medias geométricas e intervalos de confianza al 95% para cada plásmido.

Se llevó a cabo el protocolo de conjugación habitual, preincubando y conjugando en pocillo de LB agar durante 1 hora a 37°C en proporciones 1:100.

Eficiencia de conjugación en sólido (medias geométricas):

- R388: $1.6 \text{ Tc}^* \text{Don}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$.
- pSU1027: $1.6 \text{ Tc}^* \text{Don}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$.

No hay diferencia significativa entre ambas distribuciones (test t de Student dos colas, $n=12$, $P=0,96$), por lo que concluimos que el número total de copias no tiene un efecto limitante en la FC.

3.7. Efecto de la sobreexpresión del gen *stbB* sobre la eficiencia de conjugación de R388.

Aunque el número total de copias no resultó limitante en la FC, los resultados de Guynet et al (Guynet 2011) indicaban que sólo las copias asociadas al pilus (en la membrana) son capaces de conjugarse eficientemente. Dado que esta asociación está mediada por la proteína StbB, decidimos analizar si la sobreexpresión de este gen mejoraba la FC del plásmido.

Para ello se insertó el gen por ensamblaje Gibson en el vector de expresión inducible pBAD33. Se introdujo esta construcción en una cepa DH5 α (se emplea esta cepa porque es *recA*⁻ ya que de lo contrario una secuencia homóloga tan larga podría permitir una recombinación entre el

vector y el plásmido R388) junto con el plásmido R388 natural. Se empleó la cepa Bw27783 (*Rif*^R) como receptor de la conjugación. La expresión por el vector fue silenciada (preincubando con glucosa 0.5%) o activada (preincubando con arabinosa 50 μM).

Eficiencia de conjugación:

- R388+pBAD33: $2.0 \text{ Tc}^* \text{Don}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$.
- R388+pBAD33::*stbB*: $0.46 \text{ Tc}^* \text{Don}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$.

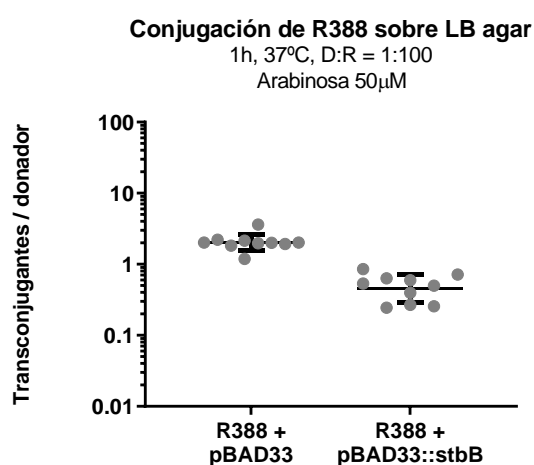


Figura R 25. Efecto de la sobreexpresión de la proteína StbB sobre la FC. Conjugación de R388 sobre LB agar durante 1 hora a 37°C en proporciones D:R = 1:100. En el eje y se representa la FC. En el eje x se indican los plásmidos que portan los donadores. Cada punto representa el promedio de tres réplicas técnicas. Se incluyen las medias geométricas e intervalos de confianza al 95% para cada plásmido.

En el artículo que describe por primera vez de forma detallada el operón *stb* de R388 (Guynet 2011), se atribuye al gen *stbA* un papel de distribuidor uniforme del plásmido R388 dentro del citoplasma bacteriano, de forma que cuando se emplea un R388 Δ *stbA* la mayoría de copias

del plásmido se localizan en los polos celulares. Esto haría aparentemente descender de manera brusca la estabilidad, que está sujeta a la partición por sistemas específicos situados cerca del centro de la célula en plásmidos grandes y de bajo número de copias como R388. Por otro lado, parece que el mutante R388 Δ *stbA* presenta mayor eficiencia de conjugación, y se especula con la posibilidad de que sea en los polos celulares donde se forman preferentemente los sistemas

de secreción de R388, que quedarían más accesibles para el plásmido mutante al iniciar la formación del relaxosoma. Sin embargo, esta hipótesis iría en contra de lo descrito por Seoane 2010: la mayoría de los eventos conjugativos exitosos realizados por pWWO (IncP-9) en *P. putida* se realiza en los laterales de la célula, y solo el 14% desde los polos. Además, en Yao 2007 se describe una fuerte influencia del plásmido pBAD33 sobre las distribuciones in vivo de otro plásmidos con los que cohabita (revisado en Wang 2017).

Por otro lado, en el artículo anteriormente citado (Guynet 2011) se describe una pérdida total de la capacidad conjugativa del mutante R388 Δ stbB (recuperada cuando se aporta el gen en trans e incluso aumentada cuando se aporta en trans a un R388 natural), y una distribución homogénea del plásmido por toda la célula. Por ello se le atribuye a stbB (una ATPasa tipo Walker) un efecto antagonista a stbA, llevando algunas copias del plásmido a los polos de la célula para favorecer la conjugación; dicha actividad sería independiente del relaxosoma y de la proteína acopladora. El gen stbB está bastante conservado en plásmidos de las familias MOB_{F11}, MOB_{P11} y MOB_{P6} y parece estar asociado a la familia MPF_T. En un estudio sobre el sistema de partición de R1 (Gruber 2016) se demostró también una interacción específica entre el sistema de partición y el relaxosoma, mejorando sensiblemente la eficiencia de conjugación del plásmido.

Así, el resultado del experimento de conjugación de R388 con sobreexpresión de stbB no desmiente la posible función de esta proteína como contrapeso a la función de stbA, que aún habría que dilucidar, pero sí deja claro que disponer de grandes cantidades del mismo no sólo no mejora la eficiencia de conjugación sino que la empeora, quizás por un fenómeno de “secuestro” del plásmido, o por un desajuste en el equilibrio entre stbA y stbB (cabe recordar que la sintenia en el operón stb es muy alta, en plásmidos conjugativos muy distantes filogenéticamente).

R4. Fabricación de una cepa movilizadora sin pérdida de señal.

En la literatura, los plásmidos conjugativos se dividen globalmente en dos categorías amplias dependiendo de su rango de hospedador. Este rango de hospedador se correlaciona de forma general con la FC. Los plásmidos de amplio rango de hospedador (IncN, IncP, IncW) muestran frecuencias de conjugación ordenes de magnitud mayores que los plásmidos de rango estrecho (IncF, IncI), que se encuentran naturalmente reprimidos para la conjugación (Meynell and Datta, 1967; Lundquist and Levin, 1986) Sin embargo, existen datos que apuntan a que los grupos “altamente conjugativos” muestran diferencias entre sí (Bradley, Taylor and Cohen, 1980; Król *et al.*, 2013) e incluso entre miembros del mismo grupo. Nuestro análisis de la transición entre una dinámica dependiente de densidad y una dependiente de frecuencia apuntaba a posibles diferencias en la FC de los distintos plásmidos analizados (Figura R11). Aunque nuestro modelo, R388, no mostró una frecuencia de movilización suficiente para generar un canal conjugativo sin pérdida de señal, decidimos analizar si otros plásmidos modelos eran capaces de hacerlo.

4.1. Medidas de eficiencia de conjugación de otros plásmidos altamente conjugativos.

Dado que hemos podido comprobar que una serie de plásmidos altamente conjugativos (y entre ellos nuestro plásmido modelo R388) tienen auto-limitada su eficiencia de conjugación quisimos comprobar si todos ellos están limitados en la misma eficiencia o si, por el contrario, esta auto-limitación es intrínseca a cada plásmido y distinta.

Para ello medimos en las mismas condiciones la producción de transconjugantes por donador según el protocolo de conjugación habitual (1 hora, 37°C, proporción 1:100 de donadores: receptores, preincubando 3 horas sin antibiótico y conjugando a altas densidades sobre pocillo de LB agar) de una colección de plásmidos altamente conjugativos y/o pertenecientes al mismo grupo de incompatibilidad que R388 (IncW).

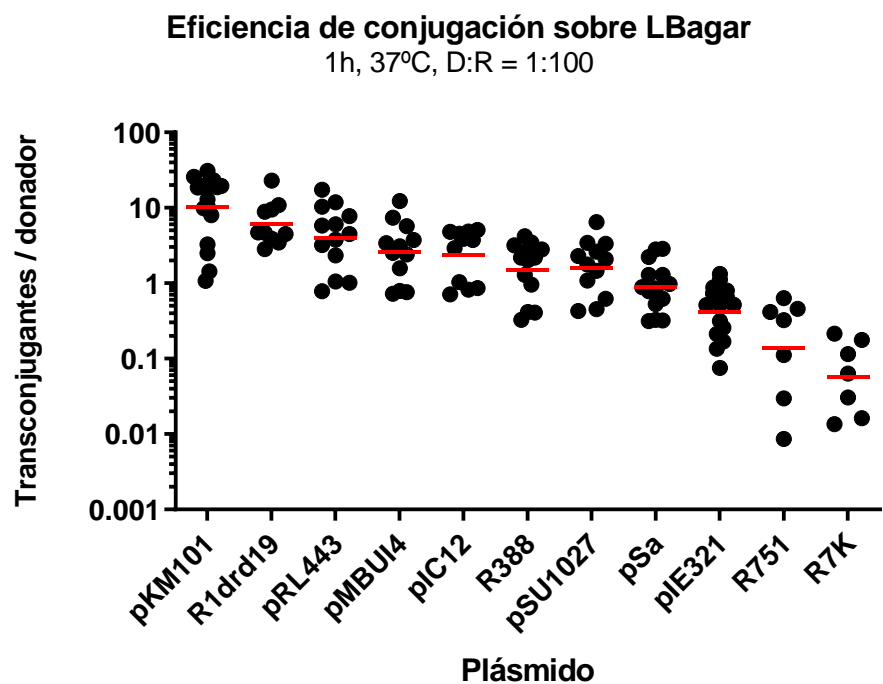


Figura R 26. Eficiencia de conjugación de distintos plásmidos conjugativos. Conjugación sobre LB agar a 37°C durante 1 hora en proporciones D:R = 1:100 de varios plásmidos altamente conjugativos. En el eje y se representa la FC (T/D), en el eje x se indica el plásmido que portan los donadores. Cada punto representa el promedio de tres réplicas técnicas. Se incluyen las medias geométricas e intervalos de confianza al 95% para cada plásmido.

Eficiencia de conjugación (medias geométricas)

- pKM101 (derivado de R46, IncN): **9.6** Tc*Don⁻¹*h⁻¹.
- R1drd19 (derivado de R1, IncF-II): **6.2** Tc*Don⁻¹*h⁻¹.
- pRL443 (derivado de RP4, IncP-1): **4.0** Tc*Don⁻¹*h⁻¹.
- pMBUI4 (IncW): **2.6** Tc*Don⁻¹*h⁻¹.
- pIC12 (derivado de R388, IncW): **2.3** Tc*Don⁻¹*h⁻¹.
- R388 (IncW): **1.5** Tc*Don⁻¹*h⁻¹.
- pSU1027 (derivado de R388, IncW): **1.6** Tc*Don⁻¹*h⁻¹.
- pSa (IncW): **0.9** Tc*Don⁻¹*h⁻¹.
- pIE321 (IncW): **0.4** Tc*Don⁻¹*h⁻¹.
- R751 (IncP-1): **0.16** Tc*Don⁻¹*h⁻¹.
- R7K (IncW): **0.06** Tc*Don⁻¹*h⁻¹.

Dentro de los plásmidos del grupo IncW (R388, pMBUI4, pSU1027, pSa, pIE321 y R7K) no observamos FC significativamente superiores a las de R388. Sin embargo, los plásmidos pKM101 (IncN), pRL443 (IncP-1a) y R1drd19 (un mutante des-reprimido del grupo IncFII) mostraron FC significativamente superiores.

La diferencia de casi un orden de magnitud en la eficiencia de conjugación entre pKM101 y R388 es muy llamativa dado que pKM101 es el plásmido conjugativo más cercano evolutivamente a los IncW. Ambos plásmidos son tan similares que pKM101 puede movilizar un plásmido que contiene la región *dtr* (oriT-TrwABC) de R388 (Bolland *et al.*, 1990). Ambos plásmidos presentan una identidad en la secuencia de aminoácidos del 30% a lo largo de toda la región de conjugación (Fernandez-Lopez 2006), con regiones de marcada homología como el origen de transferencia (Llosa 1991), así como una sintenia casi completa (especialmente en la región mob-oriT-stb), aunque esto último puede tener más relación con la necesidad de montar una estructura macromolecular compleja muy similar estructuralmente, dado que dicha sintenia se observa en mayor o menor medida en otros plásmidos conjugativos, así como en otras estructuras macromoleculares como fimbrias y flagelos. El siguiente objetivo fue determinar qué factores limitaban la eficiencia de conjugación de R388 y evitaban que alcanzase los niveles de pKM101.

4.2 Interacciones entre los sistemas conjugativos de R388 y pKM101.

4.2.1. Conjugaciones conjuntas de R388 y pKM101: Dado que pKM101 presentó la mayor eficiencia de conjugación de todos los plásmidos probados y la relativa cercanía evolutiva de éste con nuestro plásmido modelo R388 nos planteamos comprobar si había alguna interacción entre los sistemas conjugativos de ambos plásmidos cuando cohabitaban la misma célula y si la eficiencia de conjugación de R388 podría mejorar en presencia de pKM101, como ya se había descrito con otras parejas de plásmidos en la bibliografía (Sagai, Uyobe and Mitsuhashi, 1977; Morzejko, Panek and Cebrat, 1990; Getino *et al.*, 2017; Dionisio, Zilhão and Gama, 2019).

Primero medimos la eficiencia de conjugación de ambos plásmidos cuando cohabitan la misma célula frente a la eficiencia de conjugación en solitario. Para ello se utilizaron Bw27783 como donadores y receptores (Rif^R y Nx^R respectivamente) portando uno, otro o ambos plásmidos. El protocolo de conjugación fue el habitual, solo que esta vez se plaquearon las diluciones en placas con selección para donadores (Nx), receptores (Rif) y transconjugantes de R388 (Nx Tp), de pKM101 (Nx Ap) o dobles (Nx Ap Tp).

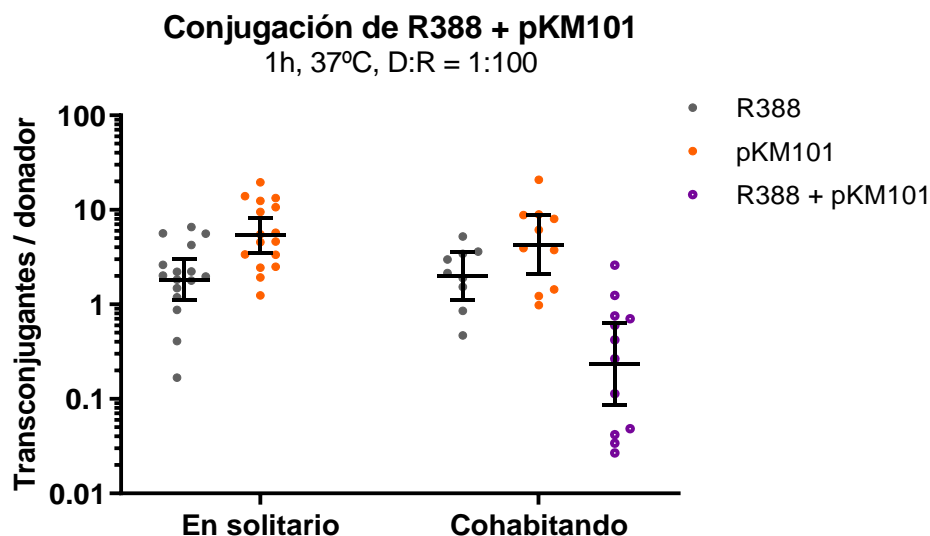


Figura R 27. Efecto de la cohabitación de los plásmidos R388 y pKM101 sobre sus respectivas FC. Experimentos de conjugación realizados durante 1 hora a 37°C en proporciones D:R = 1:100, usando donadores portando un plásmido (izquierda) o ambos plásmidos (derecha). En el eje y se muestra la FC (T/D). En el eje de las x se indican los ensayos en los que el donador porta sólo un plásmido (izquierda) o los dos (derecha). Cada punto es el promedio de tres réplicas técnicas. Gris: transconjugantes de R388, Naranja: transconjugantes de pKM101, morado: ambos.

Las medias geométricas de las eficiencias de conjugación fueron:

- R388 en solitario: **1.8 Tc*Don⁻¹*h⁻¹.**
- R388 acompañado: **1.9 Tc*Don⁻¹*h⁻¹.**
- pKM101 en solitario: **5.4 Tc*Don⁻¹*h⁻¹.**
- pKM101 acompañado: **4.3 Tc*Don⁻¹*h⁻¹.**
- Transconjugantes de R388 y pKM101: **0.2 Tc*Don⁻¹*h⁻¹.**

Las distribuciones no son diferentes entre ambas condiciones para ninguno de los dos plásmidos (test t Student dos colas no pareado, sobre los logaritmos neperianos de las medidas Tc/Don; R388, n=16 y 9, P=0.79; pKM101, n=16 y 10. P=0.53).

En la bibliografía (Sagai, Uyobe and Mitsunashi, 1977; Morzejko, Panek and Cebrat, 1990; Gama, Zilhão and Dionisio, 2017c; Getino *et al.*, 2017) habían descrito con anterioridad experimentos de conjugación de dos plásmidos cohabitando la misma cepa donadora, y los resultados han sido recientemente revisados (Dionisio, Zilhão and Gama, 2019). En estos artículos se enuncian dos posibles fenómenos en la interacción entre dos plásmidos conjugativos:

- Facilitación: aumento ligero de la eficiencia de conjugación, probablemente por estabilización del par conjugativo, siendo generalmente el más conjugativo el que facilitaba la transmisión del menos eficiente.
- Inhibición: bloqueo de la conjugación de uno de los plásmidos por un gen expresado por el otro, fenómeno más frecuente y específico que la facilitación en plásmidos que cohabitan la misma cepa donadora, se le atribuye un papel evolutivo, dado que permitiría la coexistencia de plásmidos sin hacer descender bruscamente el fitness de la cepa portadora. Esta explicación es controvertida, dado que algunos factores de inhibición de la fertilidad actúan inhibiendo componentes ya expresados del relaxosoma o del T4SS, mientras que el mayor burden impuesto por un plásmido conjugativo no se debe al envío de ADN sino a la expresión y montaje del sistema de secreción (Haft, Mittler and Traxler, 2009; San Millan and MacLean, 2017).

En un trabajo previo (Getino, 2016) se encontró que pKM101 facilitaba la conjugación de R388 aumentando su eficiencia en 3.4 veces, sin embargo, en este experimento no conseguimos repetir los resultados de dicho artículo.

Como se describe en Gama 2017, la formación de transconjugantes dobles debería estar limitada por el plásmido conjugativo menos eficiente y no se produce por vías independientes, este efecto es sencillo de comprobar cuando ninguno de los dos sistemas es suficientemente efectivo, pero tanto R388 como pKM101 producen transconjugantes de manera muy eficiente. Por ello, otro experimento tuvo que ser ideado para saber si ambos plásmidos eran completamente independientes.

4.2.2. Movilizaciones conjuntas del *mob_R388* y *mob_pKM101*: Como el plásmido pKM101 natural era mucho más conjugativo, se probó a emplear un plásmido que portaba la región *mob* del mismo en movilizaciones con la cepa W-wire para comprobar si con este relaxosoma la movilización sucedía con mayor frecuencia. Para ello se empleó el plásmido pSU4280(Llosa, Zunzunegui and de la Cruz, 2003) evolucionado (y cedido amablemente para este ensayo) por la D^a Garcillán-Barcia (pendiente de publicación) para ser movilizado por el T4SS de R388.

Para ello se introdujeron por movilización con otros donadores el pSU4280_{evo}, el pSEVA121::oriT-TrwABC o ambos en una cepa W-wire. A continuación, como en el otro experimento, se midieron las eficiencias de movilización de uno, del otro o de ambos (transconjugantes dobles), y se compararon los resultados como transconjugantes por donador. Se usan tiempos de conjugación de 30' porque ya se demostró anteriormente que la proporción T/D no aumenta más allá de este tiempo.

Movilización de *mob_R388* y *mob_pKM101* por el cable W
30', 37°C, D:R = 1:100

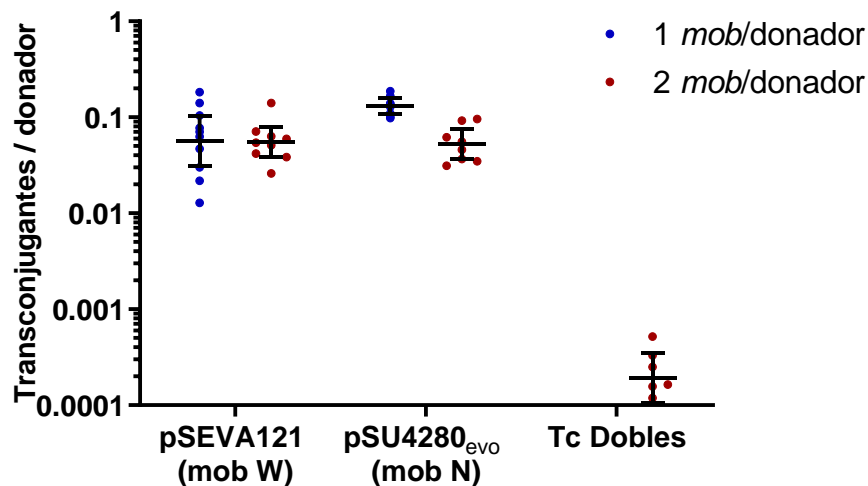


Figura R 28. Comparación de la eficiencia de movilización de pSEVA121::oriT-TrwABC (izquierda) y de pSU4280evo (derecha) por w-wire portando uno (azul) o ambos plásmidos (rojo). Las movilizaciones se realizaron a 37°C, 30 minutos, en proporción D:R = 1:100, con donadores W-wire portando el pSEVA121::oriT-TrwABC, el pSU4280evo o ambos. Se muestra en el eje Y la FC (T/D), cada punto representa el promedio de tres réplicas técnicas. Se indican las medias geométricas de cada condición con su correspondiente intervalo de confianza al 95%.

Las medias geométricas de las eficiencias de conjugación fueron:

- R388 en solitario: $5.5 \cdot 10^{-2} \text{ Tc} \cdot \text{Don}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$.
- R388 acompañado: $5.5 \cdot 10^{-2} \text{ Tc} \cdot \text{Don}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$.
- pKM101 en solitario: $0.12 \text{ Tc} \cdot \text{Don}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$.
- pKM101 acompañado: $5.0 \cdot 10^{-2} \text{ Tc} \cdot \text{Don}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$.
- Transconjugantes de R388 y pKM101: $1.8 \cdot 10^{-4} \text{ Tc} \cdot \text{Don}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$.

La movilización del mob_pKM101 por la cepa W-wire no es suficientemente elevada como para servir para la construcción del sistema Plaswires. Mientras que la movilización de mob_R388 no se ve afectada por la presencia del plásmido pSU4280evo, no sucede así a la inversa: la movilización del pSU4280evo por la cepa W-wire desciende a la mitad en presencia del pSEVA121. Quizás esto sea debido a un fenómeno de competición entre proteínas acopladoras por el sitio de unión con el sistema de secreción.

4.3. Medidas de eficiencia de movilización del sistema de pKM101.

Dado que la conjugación de pKM101 es mucho más eficiente que la de R388 se probó a medir la eficiencia de movilización de dicho sistema fragmentado en dos partes: un plásmido pKM101Δmob (Draper *et al.*, 2005) que codifica todos los genes del pilus (pMTX662, cedido por la Dra. Matxalen Llosa) y un plásmido movilizable pSU4280, que contiene el oriT-TraIJK de pKM101.

Se midieron las eficiencias de movilización en LB agar (1h, 37°C, D:R = 1:100) y se comparan con las eficiencias de movilización del pSEVA121::oriT-TrwABC por la cepa W-wire:

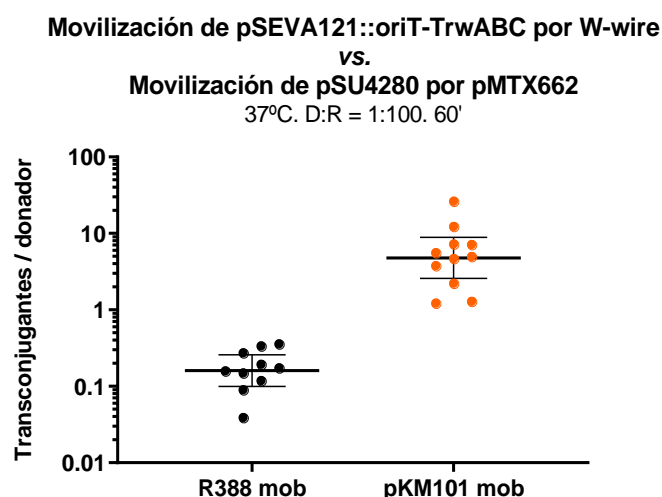


Figura R 29. Comparación de la movilización del pSEVA121::oriT-TrwABC por el W-wire frente a la movilización del pSU4280 por el pMTX662. Experimentos de conjugación realizados durante 1 hora a 37°C en proporciones D:R = 1:100. Se muestra en el eje Y la FC (T/D), cada punto representa el promedio de tres réplicas técnicas. Se indican las medias geométricas de cada condición con su correspondiente intervalo de confianza al 95%. En el eje de las x se indican los ensayos de movilización del mob de R388 (izquierda) o del mob de pKM101 (derecha).

Eficiencia de movilización:

- W-wire a pSEVA::oriT_{R388}-TrwABC: **0.15** Tc*Don⁻¹*h⁻¹.
- pMTX662 a pSU4280: **6.4** Tc*Don⁻¹*h⁻¹.

La diferencia entre la eficiencia del sistema movilizador derivado de R388 y el derivado de pKM101 es de 20-40 veces, mucho mayor incluso que la diferencia de eficiencias de conjugación entre los dos plásmidos naturales.

A continuación, repetimos los experimentos de conjugación y movilización a distintos tiempos que habíamos realizado con R388 y sus derivados, pero usando el sistema del cable de pKM101:

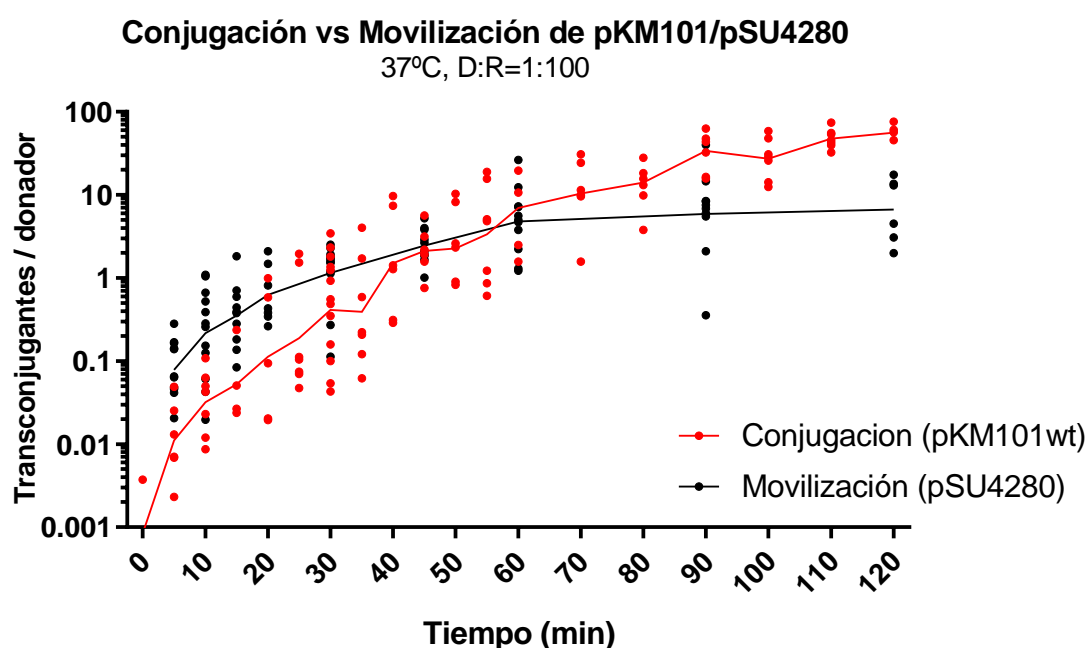


Figura R 30. Comparación entre la cinética de conjugación de pKM101 (rojo) y la cinética de movilización por el N-wire (negro). Experimentos realizados en sólido a 37°, y proporciones D:R = 1:100. En el eje y se representa la FC (T/D), cada punto es el promedio de tres réplicas técnicas. En el eje x se representa el tiempo (en minutos) que ha estado la mezcla de conjugación sobre el pocillo antes de ser levantado con PBS 1x (el punto 0 indica que se recogió la mezcla de conjugación antes de que se llegara a secar la gota sobre el LB agar. Las líneas unen las medias geométricas de los experimentos a un tiempo t.

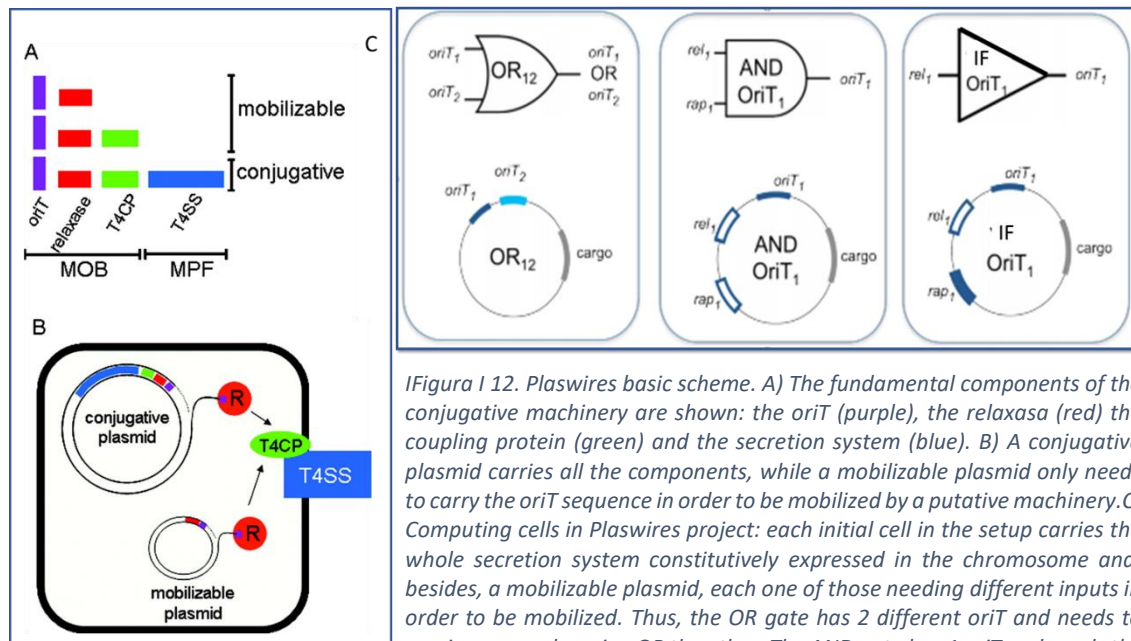
Los resultados aquí presentados demuestran que el sistema de movilización basado en pKM101 es mucho más eficiente que el que veníamos usando como modelo, basado en R388, dado que en 45 minutos consigue enviar más de un plásmido por cada donador inicial. Esto significa que la señal es emitida siempre que se reúnen los componentes necesarios para la movilización, y que, por tanto, la cepa N-wire es un buen sistema para el montaje del computador bacteriano.

Discussion

5. Discussion

5.1. The challenge of computing with plasmids

Back in the introduction section we presented a method for cellular computing using plasmid conjugation as a channel for information transmission. The basics of this system consisted of *E. coli* donor strains expressing a T4SS inserted in the chromosome (which we called “the wires” Figure D1-A), and mobilizable plasmids expressing some components of the relaxosome (“the computing plasmids” Figure D1-B). Bacterial cells would conjugate further only when receiving the right combination of computing plasmids (fulfilling the components required for conjugation), then acting as logic gates. The output of these logic gates are new components for new conjugations. Different orthogonal conjugative systems can be combined to scale the system. This basic structure allows the development of complex computation arrays such as POS and SOP doors, and eventually the generalization of the computing system into a programmable PLA, as described in the introduction.



*Figura 12. Plasmid basic scheme. A) The fundamental components of the conjugative machinery are shown: the *oriT* (purple), the relaxase (red), the coupling protein (green) and the secretion system (blue). B) A conjugative plasmid carries all the components, while a mobilizable plasmid only needs to carry the *oriT* sequence in order to be mobilized by a putative machinery. C) Computing cells in the Plasmid project: each initial cell in the setup carries the whole secretion system constitutively expressed in the chromosome and, besides, a mobilizable plasmid, each one of those needing different inputs in order to be mobilized. Thus, the OR gate has 2 different *oriT* and needs to receive one mob region OR the other. The AND gate has 1 *oriT* and needs the relaxase AND the accessory proteins. The switch needs only one input, the relaxase, to be mobilized (Adapted from Smillie et al., 2010).*

In order to compute efficiently, each plasmid transmission event must be held with the minimal loss of information possible. In general, whenever a fraction of the donors is unable to mate with the recipients in the time allocated for that computation, a loss of information occurs. As shown in figure D2, a 20% loss in transmission efficiency for each step would result in a dramatic decrease of 75% efficiency in just 2 computation steps (see Figure D2). This means that, for the system to compute in a robust manner, our conjugative systems must achieve conjugation frequencies of at least 1 T per D cell.

In order to develop an efficient computation system, we turned our attention to broad host range (BHR) conjugative plasmids (Jain and Srivastava, 2013; Brooks, Kaze and Siström, 2019). These plasmids conjugate to a wide array of bacterial species, and tend to have high conjugation frequencies (De Gelder et al., 2007; Klümper et al., 2015). Among BHR plasmids, three families stand out as classical models for conjugation studies. These include IncP plasmids, whose

prototype is RP4, the IncN group (with pKM101 as prototype) and the IncW group, with R388 as its foremost representative (Datta and Hedges, 1972; Ward and Grinsted, 1982; Avila and de la Cruz, 1988; Bolland *et al.*, 1990; Revilla *et al.*, 2008; del Campo, 2016). From these, we initially chose R388, for three major reasons:

- It represents one of the smallest BHR plasmids known (less than 40 kb) thus it can be considered as a streamlined model of a conjugative plasmid.
- It is a classical model for conjugation studies, with very detailed structural and functional knowledge available. Most of this knowledge was produced in our lab, thus we had ample experience working with it (Llosa, Bolland and de la Cruz, 1991; Llosa, Grandoso and Cruz, 1995; Cabezón, Sastre and Cruz, 1997; Moncalián *et al.*, 1999, 1997; Gomis-Rüth *et al.*, 2001; Guasch *et al.*, 2003; Llosa, Zunzunegui and de la Cruz, 2003; Garcillán-Barcia *et al.*, 2007; Fernández-González *et al.*, 2011; Guynet *et al.*, 2011)
- Transfer genes are organized in a modular way, in three major operons controlled by a regulatory network largely independent of the chromosome. This orthogonality made R388 less likely to interact in a deleterious way with the host physiology (Fernandez-Lopez and de la Cruz, 2014; Fernandez-Lopez *et al.*, 2014).

However, our initial data showed that the CF displayed by the plasmid was too low to sustain efficient computation. In our experiments, only 10% of the donors were able to transfer the plasmid to recipients (Figure R12). This means that the overall efficiency of the system dropped to <1% after just one computation step.

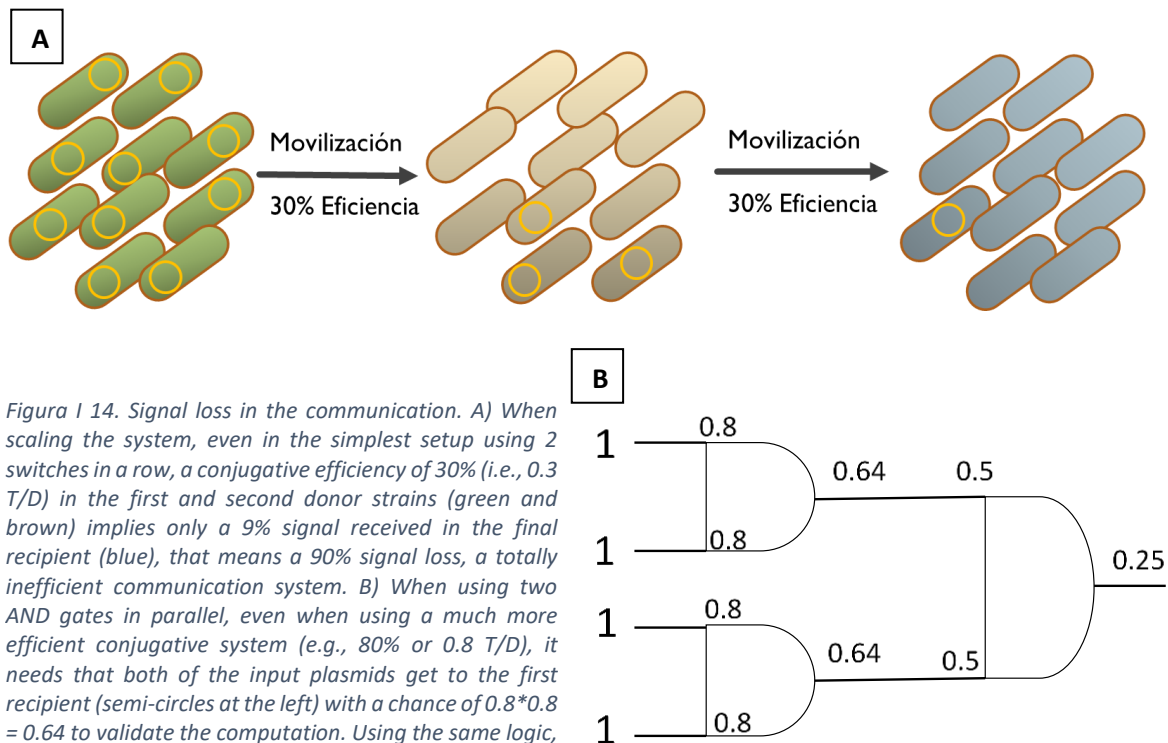


Figura I 14. Signal loss in the communication. A) When scaling the system, even in the simplest setup using 2 switches in a row, a conjugative efficiency of 30% (i.e., 0.3 T/D) in the first and second donor strains (green and brown) implies only a 9% signal received in the final recipient (blue), that means a 90% signal loss, a totally inefficient communication system. B) When using two AND gates in parallel, even when using a much more efficient conjugative system (e.g., 80% or 0.8 T/D), it needs that both of the input plasmids get to the first recipient (semi-circles at the left) with a chance of $0.8 \times 0.8 = 0.64$ to validate the computation. Using the same logic, a second AND gate reduces this efficiency to a 25%, which means a 75% signal loss.

The overall goals of this thesis project were to characterize the dynamics of plasmid transfer (R2) and identify ways of improving it (R3), in the hope that we would be able to get a super-conjugator plasmid upon which we will build our computation system. Results showed that plasmid transfer was intrinsically limited, meaning that some donors are unable to conjugate, even when recipients are readily available for long periods of time (Fig R12). An exploration of the factors limiting transfer led us to conclude that conjugation is not limited by the expression of the transfer genes (Fig R17), the availability of plasmid copies (Fig. R25), nor the ability of the conjugative pilus to adhere to the recipient cells (Fig. R24). By analysing other conjugative plasmids, we discovered that, while all of them show some degree of frequency-limited transfer, this limit is of different magnitude depending on the plasmid analysed.

5.2. Frequency-Dependent Transmission.

It was widely assumed at the beginning of this study that the spread of plasmids among natural populations was mostly limited by recipient availability. Until our experiments, nearly all conjugation models assumed that mating was a density-dependent process, limited by the rate of contact between donors and suitable recipients (Freter, Freter and Brickner, 1983; Lundquist and Levin, 1986; Simonsen *et al.*, 1990; Simonsen, 1991; MacDonald, Smets and Rittmann, 1992; Bergstrom, Lipsitch and Levin, 2000; Zhong *et al.*, 2010, 2012; Zwanzig *et al.*, 2019). The reason why is likely the influence of the first mathematical model for conjugation (Levin, Stewart and Rice, 1979) and mobilization (Levin and Stewart, 1980) introduced by Levin. In this seminal paper, the authors assumed that the formation of transconjugants along time could be modelled as a mass action law, with the rate of production of transconjugants being the product of the donor and the recipient concentration, times certain constant (Levin, Stewart and Rice, 1979).

This assumption holds true at the densities assayed in the paper, yet the range of concentrations tested was too low to generalize to high-density natural settings, such as biofilms or the gut microbiome. It is also noteworthy that this paper pre-dates the influential papers of Anderson and May (Anderson and May, 1979; May and Anderson, 1979) on epidemic modelling, when the concepts of density and frequency dependent transmission were first considered (Begon *et al.*, 2002). Thus, there was a poor understanding at that moment on the possibility of pathogen transmission being limited by factors other than exposure rates. Levin's model is, coincidentally, conceptually equivalent to a density limitation, and although posterior conjugation models grew increasingly complicated, all assumed density as the foremost limiting parameter.

Our results, however, indicate otherwise. As shown in section R2, at densities higher than 10^7 bacterial cells per millilitre transmission shows clear signs of being frequency, and not density, limited. In our case, this limit was of approximately 0.1 transconjugants per donor (as shown in Figure R11), which would lead to a dramatic decrease in the efficiency of our computational devices. Frequency-dependent transmission implies that efficiency is intrinsically limited by the vector of transmission (Begon *et al.*, 2002). Whence cellular density surpasses a given limit, transmission rates will remain the same regardless increases in recipient availability. Our results also showed that this limit is different among natural conjugative plasmids, suggesting this is an intrinsic characteristic of the plasmid itself. Why would a plasmid limit its own transmissibility? The reasons may reside in the complex evolutionary relationships established by parasites and their hosts, as discussed in the introduction.

The long-term fate of infectious agents is a fundamental question for evolutionary biology. Since damaging the host is ultimately detrimental to pathogen survival, it might seem logical for natural selection to select for attenuated variants. This “conventional wisdom”, as Anderson and May named it (Anderson, 1990) supported, therefore, that long-term evolution should turn virulent pathogens into harmless or even mutualistic entities. Sadly, prospects of peaceful coexistence with infectious agents vanished as biologists realized that horizontal transmission might compensate for the fitness loss incurred by damaging the host. For example, pathogens like *Mycobacterium leprae*, *Neisseria gonorrhoeae* or *Plasmodium falciparum* show no signs of decreasing virulence, despite a long history of coexistence with humans (Schuenemann, 2013; Rotman and Seifert, 2014). Conjugative plasmids pose a similar challenge (Turner, Cooper and Lenski, 1998). Because plasmids diminish host fitness, common wisdom suggests that natural selection should promote neutral or mutualistic plasmids (Harrison, Guymer, *et al.*, 2015; Dimitriu *et al.*, 2019). Plasmids often carry genes that are adaptive for the host under certain environmental conditions, such as Ab^R genes, xenobiotic degradation pathways and virulence factors (Van der Meer *et al.*, 1992; Top and Springael, 2003; Dennis, 2005; Baquero, Alvarez-Ortega and Martinez, 2009; Nogueira *et al.*, 2009; Norman, Hansen and Sørensen, 2009; Rankin, Rocha and Brown, 2011; Svara and Rankin, 2011). Theoretical studies have shown that, as in the case of infectious diseases, transmission could *a priori* compensate for plasmid burdens (Christensen *et al.*, 1998; Krone *et al.*, 2007; Król *et al.*, 2013) (although compensatory mutations and complex population dynamics seem helpful to achieve this in more realistic environments (Peña-Miller *et al.*, 2015; Hall *et al.*, 2016; Kottara *et al.*, 2018; Zwanzig *et al.*, 2019)). Plasmids may have then two evolutionary trajectories, one leading to a mutualistic relationship with their host, the other leading to a pure parasite. This latter option would be achievable if the plasmid spread rate is high enough to overcome the competition from plasmid-free counterparts. Whether plasmids can sustain parasitic transmission or, on the contrary, the fate of every plasmid is to be domesticated by its host, has drawn considerable attention in the past, yet remains an open question (Simonsen, 1991; Bergstrom, Lipsitch and Levin, 2000; De Gelder *et al.*, 2008; Sota *et al.*, 2010; Harrison and Brockhurst, 2012; Darmon and Leach, 2014; Millan *et al.*, 2014; San Millan, Heilbron and MacLean, 2014; Rodriguez-Beltran *et al.*, 2018).

Our results impose a limit on the power of transmission alone to compensate for the fitness deficit imposed on the host. When calculating the rates of transmission required for plasmids to sustain parasitic transmission Levin’s own results and many papers produced afterwards stressed the importance of population density as a key factor ((Levin, Stewart and Rice, 1979; Bradley, Taylor and Cohen, 1980; Levin and Stewart, 1980; Freter, Freter and Brickner, 1983; Lundquist and Levin, 1986; Simonsen *et al.*, 1990; MacDonald, Smets and Rittmann, 1992; Wan *et al.*, 2011; Zhong *et al.*, 2012)). This is hardly surprising, since in a pure DDT model transmission depends on density at all cell concentrations. Thus, it naturally follows that there is some density in which transfer is high enough to overcome a given level. Under FDT however, this is not true. FDT imposes an upper bound on the number of transmission events achievable, regardless of density or population structure. If this level of transmission is enough to overcome competition from plasmid-free cells, then the plasmid may spread in a purely parasitic manner. If this transfer limit is below, the plasmid will decline to extinction unless it is actively selected for.

Our results (Figure R11) indicate that all plasmids tested showed an FDT limitation, albeit with significantly different threshold levels. The reason for different FDT limits observed among natural plasmids may reside in the alternate evolutionary relationships established between plasmids and their hosts. There is evidence that, in plasmids, transmission and burden are

inversely correlated. For example, de-repressed IncF plasmids experience higher transmission rates, but impose much higher metabolic cost on their hosts (Haft, Mittler and Traxler, 2009). Evolution will tend to select for an optimal transmission/burden ratio, but since in real life both quantities depend on a number of different factors (like the frequency of exposures to susceptible recipients, the host range of the plasmid, etc.), different plasmids may reach different solutions. Thus, as in classical parasites, evolution will not lead to a global decrease in transmissibility, but to a wide distribution of transmission/burden rates. Thus, natural plasmids will display a range of conjugation frequencies, the same way as pathogens display different infection rates, depending on their evolutionary history. Moreover, plasmids often compensate their burden by carrying beneficial traits for their hosts, such as antibiotics or heavy metal resistance genes. While living in selective environments, where the benefits outweigh the costs, plasmids may persist near fixation through positive selection (Millan *et al.*, 2014; Peña-Miller *et al.*, 2015; Hall *et al.*, 2016). Many of the traits encoded by plasmids are considered “social” genes (antibiotic resistance, xenobiotics catabolism, pathogenicity) that do not require to be fixated in the population to exert an overall beneficial effect (Christensen *et al.*, 1998; Fox *et al.*, 2008; Reisner, Wolinski and Zechner, 2012; Król *et al.*, 2013; Stalder and Top, 2016b). Thus, plasmids may survive even if they colonize only a fraction of the entire host population. Another mechanism that may favour plasmid persistence is biofilm formation (Ghigo, 2001), which is a common survival strategy in bacteria (Hall-Stoodley, Costerton and Stoodley, 2004) and creates a feedback system that favours HGT (Molin and Tolker-Nielsen, 2003; Madsen *et al.*, 2012; Stalder and Top, 2016b), although this commonly accepted premise has been challenged in several works (Licht *et al.*, 1999; Haagensen *et al.*, 2002; Lilley and Bailey, 2002; Król *et al.*, 2013). Thus, it is possible that plasmids that do not show transmission rates enough to sustain parasitic transmission survival by engaging in one or several of these mutualistic interactions.

Results from our laboratory showed that, at least, plasmids R388, pKM101 and RP4 are able to sustain parasitic transmission (del Campo, 2016). In the particular case of R388, although a majority (~90%) of donors are incapable of transmitting the plasmid in a generation time, the burden imposed to the plasmid is below 10%, hence the plasmid does not dilute out as the population grows (del Campo, 2016). However, our results showed that this successful transmission requires secondary conjugation (transmission from the transconjugants to the recipients) (FIGURE R14b). Since our computing device lack this ability (they are mobilizable plasmids), we suffer from a considerable loss of efficiency due to FDT. To devise strategies to compensate for this loss of efficiency, we first tried to identify what factors contribute to the FDT limitation.

5.3. Limiting factors on conjugation efficiency

When we measured the transmission efficiency in R388, other IncW plasmids and some distant relatives, like pKM101, we found a striking diversity in conjugation efficiencies (Figure R27). This is surprising because plasmids from the IncW group (R388, pIE321, R7K, pSa) exhibit nearly identical genome structures, with >90% identity at the protein sequence level among them

(Revilla *et al.*, 2008). In the case of R388 and pKM101, there is also a considerable conservation in synteny and at the protein sequence level (>40%) (Llosa, Bolland and de la Cruz, 1991; Fernández-López *et al.*, 2006). Recent structural analysis have shown that their transfer machineries show equivalent arrangements (Fronzes *et al.*, 2009; Rivera-Calzada *et al.*, 2013; Low *et al.*, 2014). Because of these data we hypothesized that the differences in conjugation

efficiency might be caused by different transcriptional levels of the conjugation machinery. There is ample evidence that plasmids exert strong regulation on the expression of transfer genes (Haft, Mittler and Traxler, 2009; Frost and Koraimann, 2010; Fernandez-Lopez *et al.*, 2014; Koraimann and Wagner, 2014; del Campo, 2016; San Millan and MacLean, 2017). In particular, natural plasmids from the IncF group exhibit poor conjugation frequencies due to their overall repression of *tra* genes (Meynell and Datta, 1967; Pölzleitner *et al.*, 1997; Frost and Koraimann, 2010). Gene expression is the foremost contributor to the metabolic burden imposed by plasmids to their hosts, therefore it is likely under strong selective pressure (Humphrey *et al.*, 2012; San Millan and MacLean, 2017).

Moreover, the conjugative pilus is the specific receptor of a variety of bacteriophages (Meynell and Datta, 1967; Bradley, 1979; Riede and Eschbach, 1986; Click and Webster, 1997; Grahn *et al.*, 1997; Marvin, 1998; Yeo *et al.*, 2003; Meng *et al.*, 2019). Repressing the expression of the pilus would then reduce exposure to these phages. The conjugative pilus of R388 serves as receptor for phages like PRD-1 (Olsen, Siak and Gray, 1974; Grahn *et al.*, 1997), and the gene regulation network that controls the conjugation machinery is dominated by transcriptional repression (Fernandez-Lopez *et al.*, 2014; del Campo, 2016). Hence, we reasoned that maybe R388 conjugation was limited by the expression of TRA genes. Also, previous results from our lab (Bolland *et al.*, 1990) showed that overexpression of the whole T4SS under P_{lac} control led to increased conjugation efficiency.

Unfortunately, we were not able to replicate these results. In our hands, overexpression of *tra* genes alone, or in their respective operons (Figures R17) did not improved the conjugation efficiency or did it only marginally. It is likely that the apparent increase in the conjugation frequency observed by Bolland resulted from the deleterious effect caused by induction of *tra* genes in the donors, which experience an overall decrease in viability (results not shown). Since the conjugation efficiency is the ratio of viable T divided by viable D cells, a decrease in the latter generates an artifactual increase in the measure.

We only obtained marginal gains in the conjugation frequency when we overexpressed the constructions pBAD33::TrwMKJI and pBAD33::TrwHGFED, suggesting that an overall increase in dose is not a viable option to boost the conjugation frequency. Among individual genes, the only one generating an effect statistically significant was *trwJ*, the gene encoding the adhesin of the pilus. The adhesin is the protein of the conjugative apparatus that is thought to mediate the initial contact to the recipient, probably in the pilus tip (Bradley, 1979; Yeo *et al.*, 2003; Yuan *et al.*, 2005; Aly and Baron, 2007). In the case of pKM101, there is evidence that the adhesion is exported separately from the rest of the transfer machinery (Schmidt-Eisenlohr, Domke and Baron, 1999; Lacroix and Citovsky, 2011; González-Rivera *et al.*, 2019), acting as a selectivity determinant for recipients and phages (Bradley, 1979; Yeo *et al.*, 2003; Aly and Baron, 2007). While the effects of overexpressing *trwJ* were not terribly promising (Figure R17), there were evidences in the literature that adhesin genes could be key in mediating conjugation efficiency. There were several reports involving plasmid pTi (Lacroix and Citovsky, 2011) and plasmid pKM101 (González-Rivera *et al.*, 2019), in which the adhesin contributed critically to conjugation efficiency. In particular, a report from Yeo *et al.* (Yeo *et al.*, 2003) showed that a point mutation in *traC*, the adhesin of pKM101, caused a 100-fold increase in conjugation frequency. This was particularly useful for our goals, since pKM101 and R388 show, as discussed before, extensive sequence and structural homology. By performing sequence alignments and structural predictions, as described in Results (3.5.1), we identified the target region in *trwJ*. Alas, there was no absolute sequence conservation, thus it was not possible to translate directly the

mutation described in Yeo et al. Instead, we chose to mutate the residues around the position, trying to mimic its effect. As shown in results, this did not cause an increase in the conjugation frequency (Figure R21). When we tried to replicate the results of Yeo et al. (Figure R23) we were unable to do so.

Adhesion was, however, a critical point when assaying R388 conjugating in liquid. In natural conditions, plasmid R388 mates hardly in liquid cultures (100-1000 fold decrease in conjugation efficiency, Figure R24, left), and requires instead a solid surface like other broad host range plasmids like pKM101 and RP4. When we introduced the intimin/receptor system described in (Salema *et al.*, 2013; Salema and Fernández, 2017), we obtained efficient conjugation in liquid cultures (Figure R24, left). However, we observed no improvement on solid surfaces. Together with previous results, this pointed out to adhesion not being a strong limiting factor in the conjugation efficiency of plasmid R388 (Figure R24, right).

Another factor we analysed was the availability of plasmid copies by the transfer machinery. Attempts to increase the conjugation efficiency by increasing the plasmid copy number did not yield positive results (Figure R25). This indicated that the overall copy number was not a limiting factor. However, it could be possible that the lack of specific contacts between plasmid copies and their cognate relaxosome/T4SS channels could be causing 90% of the donors to err conjugation. Evidence suggesting this possibility came from previous results from our lab, which showed an important link between the location of plasmid copies in the cytoplasm and conjugation frequencies (Guynet *et al.*, 2011). In particular, in R388, the non-canonical partition system *stbABC* seems to work as a distributor of plasmid copies across the cytoplasm. Some of these copies are linked to the nucleoid (via *StbA*), others are in contact to the cell membrane. Mutants in *stbB*, a walker-type ATPase, show exclusively nucleoid-based locations, experiencing a dramatic loss in conjugation efficiency. This led the authors to propose that *stbB* may be specifically linking plasmid copies to the relaxosome/T4SS components in the membrane. We thus tested whether an overexpression of this protein increased the conjugation frequency but, again, obtained negative results (Figure R26).

Overall, neither expression of the transfer apparatus, cell-to-cell adhesion nor plasmid copy number were found to be limiting plasmid propagation. What is causing, then, the radical difference between pKM101 and R388? As we discussed before, these two plasmids present similar transfer apparatus in terms of sequence identity, gene order and structural conservation (Bolland *et al.*, 1990; Llosa, Bolland and de la Cruz, 1991; Fernández-López *et al.*, 2006; Fronzes *et al.*, 2009; Rivera-Calzada *et al.*, 2013; Low *et al.*, 2014). Yet pKM101 is able to easily produce more than 1 transconjugant per donor in one generation time, while plasmid R388 produces 0.1. It is possible that this different conjugation efficiency is not due to a single factor, but the by-product of multiple ones. Plasmid pKM101 belongs to the IncN group, a commonly found, widely distributed plasmid group that is very common in *Escherichia coli* and other Enterobacteria (Lanza *et al.*, 2014). In contrast, plasmid R388 belongs to the IncW. Members of this family are rarely found in enterobacteria, with only five members present in the databases (R388, pKM101, pIE321, pSa and pIE522). In contrast, there are more than 50 IncN plasmid genomes in RefSeq84. This suggests that IncN plasmids are more widespread and probably more adapted to *E. coli* and other enterobacteria than IncW counterparts, a possibility also suggested by analysis of their genomeric features (Campbell, Mrázek and Karlin, 1999; van Passel *et al.*, 2006; Suzuki *et al.*, 2010; Suzuki, Brown and Top, 2018). If the superior transfer abilities of pKM101 are the result of a co-adaptation to enterobacteria, and caused by multiple epistatic interactions (Harrison and Brockhurst, 2012; San Millan, Heilbron and MacLean, 2014), it would be extremely hard to

translate these mutations into R388. For this reason, we opted instead to take a straightforward approach and re-build our conjugative wires upon the sequence of pKM101. This approach was not without risk, since it was not entirely obvious that the superior conjugation frequencies exhibited by pKM101 were due to differences exclusively at the transfer region.

5.4. Obtaining a super-conjugator and implications for building a conjugation-based logic device.

When we re-build our wiring system upon the sequence of plasmid pKM101 we were able to obtain mobilization frequencies significantly higher than its IncW counterpart. This indicates that differences in the conjugation efficiency of these plasmids reside in their mating apparatus, despite the extensive sequence and structural conservation among the two of them. Determining whether this is due to a more extensive coevolution between IncN plasmids and Enterobacteria, or alternatively it is precisely this superior conjugation rate what boosts the IncN prevalence among these species, requires further research. While it is true that IncW plasmids are rarer than IncN in enterobacteria, the same is also true for IncP plasmids (which also show a foreign genometric signature (Suzuki *et al.*, 2010; Norberg *et al.*, 2011)). Yet plasmid RP4 is able to conjugate at 10x higher frequencies than R388. These differences indicate that the reasons why some plasmids mate at much higher frequencies are far from being disentangled and requires more research.

In practical terms, however, our pKM101-derived wire (N-wire) was able to yield more than 1 transconjugant per donor during mobilization (Figure R31). This is enough to sustain plasmid propagation without losses, thus enabling the PLASWIRES strategy outlined in the introduction. In particular, combining our N-wire with the RP4-derived MFD λ pir strain (Ferrières *et al.*, 2010) we could now generate a two-step computation procedure with minimal signal loss. However, in order to scale up our computing system we need a good collection of different, orthogonal conjugative systems with FDT limits above 1 transconjugant per donor. Finding them may be a complicated task. While, in nature, there is a vast diversity of conjugative plasmids, the need for orthogonality makes it likely that each computing step must be undertaken by secretion systems separated for different MPF groups (Smillie *et al.*, 2010; Garcillán-Barcia and de la Cruz, 2013; Guglielmini, De La Cruz and Rocha, 2013; Shintani, Sanchez and Kimbara, 2015). And while the number of plasmids known is large, the number of MPF groups described is not so. Some groups are not as characterized as those we used in this work; thus they might be prone to unwanted behaviour when introduced as wires. In particular, we must be aware of the multiple interactions that different plasmid groups exert between each other, many of them impeding conjugation (Olsen and Shipley, 1975; Sagai, Uyobe and Mitsunashi, 1977; Harrison and Brockhurst, 2012; Gama, Zilhão and Dionisio, 2017b; Getino *et al.*, 2017; Getino and de la Cruz, 2018; Dionisio, Zilhão and Gama, 2019). A plasmid group highly prevalent in Enterobacteria and showing high conjugation frequency is the IncC (Harmer and Hall, 2015). This is likely the most promising candidate to generate a third orthogonal, efficient plasmid-wire. With three orthogonal wires we would be able to build much more complex architectures, paving the road to achieve a programmable logic array.

There is also extensive room for improvement by introducing other components that would be very interesting and, likely, easy to implement. For example, directionality could be introduced by using different combinations of entry/surface exclusion systems (Garcillán-Barcia and de la Cruz, 2008). Also, rebooting of the system could be achieved by generating a plasmid curing

system based on CRISPR-Cas9 targeting *oriV* sequences (Lauritsen *et al.*, 2017), a toxin-antitoxin curing system (Kamruzzaman *et al.*, 2017), or using thermosensitive replicons (Hashimoto and Sekiguchi, 1976) or suicide replicons (Inuzuka and Helinski, 1978). Thus, apart from their orthogonality from the chromosome, their non-essential nature, and their experimental tractability, plasmids also offer a very broad toolkit for synthetic biology applications.

Conclusions

6. Conclusions

1. We set up a highly sensitive protocol for precisely measuring conjugation frequencies with minimal error rates.
2. Plasmid transmission follows a frequency-dependent law at natural densities, such as those found in biofilms and the gut microbiota. This imposes an upper limit on the conjugation rates of natural plasmids.
- 3.- This upper limit is not imposed by the transcriptional rate of the transfer operon, the attachment ability of the conjugative pilus, the plasmid copy number nor the availability of plasmid copies for the transfer machinery.
- 4.- The fact that evolutionary related plasmids show very different frequency limits suggests that co-evolution between the plasmid and the host may be critical in determining the maximal conjugational efficiency.
5. Taking advantage of the superior conjugation ability of plasmid pKM101, we built a conjugation system able to transmit plasmids without loss in biocomputing devices.

Resumen en castellano

7. Resumen en castellano

7.1. Computar con plásmidos

En la Introducción se ha presentado un novedoso sistema de computación biológica basado en la movilización de plásmidos que contienen módulos necesarios para la conjugación entre células que tienen insertados sistemas de secreción en sus cromosomas. El diseño de este sistema permite que las bacterias en el medio se comporten como puertas lógicas, cuyas conexiones de entrada y salida son los sistemas de secreción de sistemas conjugativos (de otras células o propios, respectivamente).

Para que este sistema pueda funcionar era fundamental construir por un lado las cepas con el sistema de secreción inserto en el cromosoma. Una de ellas fue donada por el Dr. Mazel (P-wire o MFDpir), y la otra (W-wire) fue construida por la Dra. Garcillán-Barcia, que también construyó todos los plásmidos modulares necesarios para realizar la computación.

El problema del W-wire es que el sistema conjugativo de R388 no es tan eficiente como el de RP4, del que deriva el P-wire, de forma que sólo 1 de cada 10 donadores es capaz de producir un transconjugante. Una pérdida de señal en el proceso conjugativo impide en gran medida el desempeño correcto del sistema cuando se acoplan más de dos “capas” de conjugación en serie, especialmente si una célula/puerta lógica debe recibir dos o más plásmidos para realizar el cálculo lógico. Como nosotros queremos poder construir un sistema con tantas capas como sean posibles para poder realizar cálculos tan complejos como deseemos, necesitamos un sistema conjugativo muy eficiente, que no presente pérdidas de señal.

Para conseguir esto nos propusimos estudiar en detalle el mecanismo de conjugación de R388 y sus dinámicas de expansión en una población de receptores. El objetivo era determinar qué provocaba esta pérdida de señal y solventar el problema si era posible.

7.2. Transmisión dependiente de frecuencia

Los plásmidos se transmiten de forma vertical o vegetativa durante la división celular y de forma horizontal o activa durante la conjugación. Ambos modos de transmisión están imbricados en un delicado equilibrio. Pese a contar con sistemas de partición activa y de adicción molecular, los plásmidos no pueden contar sólo con el mantenimiento vegetativo, ya que ocasionan un gasto para sus portadores que les hace poco competitivos. Por ello, deben recurrir a la transmisión horizontal, pero ésta implica un gasto energético aún mayor para sus hospedadores: deben afinar delicadamente la expresión de su maquinaria conjugativa para maximizar la conjugación minimizando el gasto.

Esto lleva a que los plásmidos se comporten como otros sistemas parásito-hospedador, aumentando su eficiencia de infección cuando aumenta la disponibilidad de individuos infectables, pero limitando esa eficiencia a partir de cierta densidad. La densidad a la que podemos encontrar plásmidos altamente conjugativos en cepas bacterianas de interés (biofilms, microbiota) y la densidad a la que nosotros realizamos la biocomputación es muy superior a esa densidad de transición a partir de la cual los plásmidos están auto-limitados.

La limitación auto-impuesta por los plásmidos cambia entre especies, entre cepas y entre plásmidos, incluso entre algunos muy parecidos, posiblemente debido a largas historias de evolución y coadaptación en las que muchos otros factores entraron en juego. De esta forma, R388 parece tener una eficiencia intermedia, habiendo otros plásmidos similares a él que conjugan hasta 10 veces más.

7.3. Factores limitantes en la conjugación de R388.

Para determinar qué factores estaban limitando la eficiencia de conjugación de R388 probamos varias estrategias: aumentar la dosis de algunos genes o grupos de genes por si estaban actuando como factores limitantes, aumentar el número de copias del plásmido por si la maquinaria de conjugación no lo encontraba dentro de la célula, aumentar la adhesividad de las bacterias sobreexpresando la adhesina de R388 o el sistema artificial tir/intimina, aumentar la expresión del gen *stbB* aparentemente implicado en el equilibrio transmisión vertical-horizontal y mutagénesis dirigida del gen *trwJ* descrito como posible candidato para este efecto.

Ninguna de las estrategias tuvo el efecto deseado en la eficiencia conjugativa, lo cual solo significa que, de haber un factor limitante, no lo hemos encontrado aún. Sin embargo, esto nos hizo plantearnos buscar otros sistemas conjugativos que, simplemente, fueran más eficientes de manera natural.

7.4. Construcción de una cepa movilizadora eficiente.

Tomamos el plásmido pKM101 porque, en las mismas condiciones experimentales conjugaba entre 5 y 10 veces mejor que R388. Cuando medimos su capacidad de movilización empleando dos plásmidos (cedidos por la doctora Matxalen Llosa) que contenían uno la región mob (pSU4280, contiene el *oriT*, gen de la relaxasa, gen de la proteína acopladora y gen de las proteínas accesorias) y otro la región mpf (pMTX662, contiene los genes del sistema de secreción), observamos que la eficiencia de movilización.

Se insertó la región mob en la cepa MG1655 de E.coli mediante un sistema pOSIP y se midieron las eficiencias de movilización del pSU4280. Efectivamente, esta cepa movilizadora es mucho más eficiente que la derivada de R388 y por ello será la base de nuestro sistema junto con la cepa MFDpir.

Bibliography

6. Bibliography

- Adleman, L. (1994) 'Molecular computation of solutions to combinatorial problems', *Science*, 266(5187), pp. 1021–1024. doi: 10.1126/science.7973651.
- Aly, K. A. and Baron, C. (2007) 'The VirB5 protein localizes to the T-pilus tips in *Agrobacterium tumefaciens*', *Microbiology*, 153(11), pp. 3766–3775. doi: 10.1099/mic.0.2007/010462-0.
- Anderson, R. M. (1990) 'Parasite–host coevolution', *Parasitology*, 100(S1), pp. S89–S101. doi: 10.1017/S0031182000073042.
- Anderson, R. and May, R. (1979) 'Population biology of infectious diseases: Part I', *Nature*. Available at: <http://www.nature.com/nature/journal/v280/n5721/abs/280361a0.html%5Cnpapers2://publication/uuid/36FFBCB6-E8C2-4E0F-A08E-131E908EDBDF>.
- Andrup, L. and Andersen, K. (1999) 'A comparison of the kinetics of plasmid transfer in the conjugation systems encoded by the F plasmid from *Escherichia coli* and plasmid pCF10 from *Enterococcus faecalis*', *Microbiology*, 145(8), pp. 2001–2009. doi: 10.1099/13500872-145-8-2001.
- Anjum, M. *et al.* (2018) 'A culture-independent method for studying transfer of IncI1 plasmids from wild-type *Escherichia coli* in complex microbial communities', *Journal of Microbiological Methods*. Elsevier, 152(July), pp. 18–26. doi: 10.1016/j.mimet.2018.07.009.
- Arechaga, I. *et al.* (2008) 'ATPase activity and oligomeric state of TrwK, the VirB4 homologue of the plasmid R388 type IV secretion system', *Journal of Bacteriology*, 190(15), pp. 5472–5479. doi: 10.1128/JB.00321-08.
- Avila, P. and de la Cruz, F. (1988) 'Physical and genetic map of the IncW plasmid R388', *Plasmid*, 20(2), pp. 155–157. doi: 10.1016/0147-619X(88)90019-4.
- Babić, A. *et al.* (2008) 'Direct visualization of horizontal gene transfer', *Science*, 319(5869), pp. 1533–1536. doi: 10.1126/science.1153498.
- Bale, M. J., Fry, J. C. and Day, M. J. (1987) 'Plasmid transfer between strains of *Pseudomonas aeruginosa* on membrane filters attached to river stones', *Journal of General Microbiology*, 133(11), pp. 3099–3107.
- Baltrus, D. A. (2013) 'Exploring the costs of horizontal gene transfer', *Trends in Ecology and Evolution*. Elsevier Ltd, 28(8), pp. 489–495. doi: 10.1016/j.tree.2013.04.002.
- Baquero, F., Alvarez-Ortega, C. and Martinez, J. L. (2009) 'Ecology and evolution of antibiotic resistance', *Environmental Microbiology Reports*, 1(6), pp. 469–476. doi: 10.1111/j.1758-2229.2009.00053.x.
- Barry, K. E. *et al.* (2019) 'Don't overlook the little guy: An evaluation of the frequency of small plasmids co-conjugating with larger carbapenemase gene containing plasmids', *Plasmid*. Elsevier, 103(December 2018), pp. 1–8. doi: 10.1016/j.plasmid.2019.03.005.
- Baxter, J. C. and Funnell, B. E. (2014) 'Plasmid Partition Mechanisms', *Microbiology Spectrum*, 2(6), pp. 1–20. doi: 10.1128/microbiolspec.plas-0023-2014.
- Begon, M. *et al.* (2002) 'A clarification of transmission terms in host-microparasite models: Numbers, densities and areas', *Epidemiology and Infection*, 129(1), pp. 147–153. doi: 10.1017/S0950268802007148.

- Bentley, W. E. *et al.* (1990) 'Plasmid-encoded protein: The principal factor in the "metabolic burden" associated with recombinant bacteria', *Biotechnology and Bioengineering*, 35(7), pp. 668–681. doi: 10.1002/bit.260350704.
- Bergstrom, C. T., Lipsitch, M. and Levin, B. R. (2000) 'Natural selection, infectious transfer and the existence conditions for bacterial plasmids', *Genetics*, 155(4), pp. 1505–1519.
- Blake, W. J. *et al.* (2003) 'Noise in eukaryotic gene expression', *Nature*, 422(6932), pp. 633–637. doi: 10.1038/nature01546.
- Blattner, F. R. *et al.* (1997) 'The complete genome sequence of Escherichia coli K-12.', *Science (New York, N.Y.)*, 277(5331), pp. 1453–62. doi: 10.1126/science.277.5331.1453.
- Bolland, S. *et al.* (1990) 'General organization of the conjugal transfer genes of the IncW plasmid R388 and interactions between R388 and IncN and IncP plasmids.', *Journal of bacteriology*, 172(10), pp. 5795–802. doi: 10.1128/jb.172.10.5795-5802.1990.
- Boros, I., Pósfai, G. and Venetianer, P. (1984) 'High-copy-number derivatives of the plasmid cloning vector pBR322', *Gene*, 30(1–3), pp. 257–260. doi: 10.1016/0378-1119(84)90130-6.
- Bosi, E., Fani, R. and Fondi, M. (2011) 'The mosaicism of plasmids revealed by atypical genes detection and analysis', *BMC Genomics*, 12. doi: 10.1186/1471-2164-12-403.
- Bottery, M. J., Wood, A. J. and Brockhurst, M. A. (2017) 'Adaptive modulation of antibiotic resistance through intragenomic coevolution', *Nature Ecology and Evolution*. Springer US, 1(9), pp. 1364–1369. doi: 10.1038/s41559-017-0242-3.
- Bouma, J. E. and Lenski, R. E. (1988) 'Evolution of a bacteria/plasmid association', *Nature*, 335(6188), pp. 351–352. doi: 10.1038/335351a0.
- Bradley, D. E. (1979) 'Morphology of pili determined by the N incompatibility group plasmid N3 and interaction with bacteriophages PR4 and Ike', *Plasmid*, 2(4), pp. 632–636. doi: 10.1016/0147-619X(79)90061-1.
- Bradley, D. E., Taylor, D. E. and Cohen, D. R. (1980) 'Specification of surface mating systems among conjugative drug resistance plasmids in Escherichia coli K-12', *Journal of Bacteriology*, 143(3), pp. 1466–1470.
- Brooks, L. E., Kaze, M. and Sistro, M. (2019) 'Where the plasmids roam: Large-scale sequence analysis reveals plasmids with large host ranges', *Microbial Genomics*, 5(1). doi: 10.1099/mgen.0.000244.
- Brown, C. J. *et al.* (2013) 'Diverse Broad-Host-Range Plasmids from Freshwater Carry Few Accessory Genes', *Applied and Environmental Microbiology*, 79(24), pp. 7684–7695. doi: 10.1128/aem.02252-13.
- Buckner, M. M. C., Ciusa, M. L. and Piddock, L. J. V. (2018) 'Strategies to combat antimicrobial resistance: Anti-plasmid and plasmid curing', *FEMS Microbiology Reviews*, 42(6), pp. 781–804. doi: 10.1093/femsre/fuy031.
- Cabezón, E. *et al.* (2015) 'Towards an integrated model of bacterial conjugation', *FEMS Microbiology Reviews*, 39(1), pp. 81–95. doi: 10.1111/1574-6976.12085.
- Cabezón, E., Sastre, J. I. and Cruz, F. de la (1997) 'Genetic evidence of a coupling role for the TraG protein family in bacterial conjugation', *Molecular and General Genetics MGG*, 254(4), pp. 400–406. doi: 10.1007/s004380050432.
- Campbell, A., Mrázek, J. and Karlin, S. (1999) 'Genome signature comparisons among

- prokaryote, plasmid, and mitochondrial DNA', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(16), pp. 9184–9189. doi: 10.1073/pnas.96.16.9184.
- del Campo, I. *et al.* (2012) 'Determination of conjugation rates on solid surfaces', *Plasmid*. Elsevier Inc., 67(2), pp. 174–182. doi: 10.1016/j.plasmid.2012.01.008.
- del Campo, I. (2016) 'Estudio de la red de regulación global de R388'.
- Campos, M. *et al.* (2019) 'Simulating Multilevel Dynamics of Antimicrobial Resistance in a Membrane Computing Model', *mBio*, 10(1), pp. 1–17. doi: 10.1128/mBio.02460-18.
- Carattoli, A. (2013) 'Plasmids and the spread of resistance', *International Journal of Medical Microbiology*. Elsevier GmbH., 303(6–7), pp. 298–304. doi: 10.1016/j.ijmm.2013.02.001.
- Carattoli, A. *et al.* (2014) 'In Silico detection and typing of plasmids using plasmidfinder and plasmid multilocus sequence typing', *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58(7), pp. 3895–3903. doi: 10.1128/AAC.02412-14.
- Cascales, E. and Christie, P. J. (2003) 'The versatile bacterial type IV secretion systems', *Nature Reviews Microbiology*, 1(2), pp. 137–149. doi: 10.1038/nrmicro753.
- César, C. E. *et al.* (2006) 'A new domain of conjugative relaxase TrwC responsible for efficient oriT-specific recombination on minimal target sequences', *Molecular Microbiology*, 62(4), pp. 984–996. doi: 10.1111/j.1365-2958.2006.05437.x.
- Chandler, M. and Galas, D. J. (1983) 'Cointegrate formation mediated by Tn9. II. Activity of IS1 is modulated by external DNA sequences', *Journal of Molecular Biology*. doi: 10.1016/S0022-2836(83)80227-7.
- Christensen, B. B. *et al.* (1998) 'Establishment of new genetic traits in a microbial biofilm community', *Applied and Environmental Microbiology*, 64(6), pp. 2247–2255.
- Christensen, B. B., Sternberg, C. and Molin, S. (1996) 'Bacterial plasmid conjugation on semi-solid surfaces monitored with the green fluorescent protein (GFP) from *Aequorea victoria* as a marker', in *Gene*. doi: 10.1016/0378-1119(95)00707-5.
- Christie, P. J. *et al.* (2005) 'Biogenesis, Architecture, and Function of Bacterial Type Iv Secretion Systems', *Annual Review of Microbiology*, 59(1), pp. 451–485. doi: 10.1146/annurev.micro.58.030603.123630.
- Clark, A. J. and Adelberg, E. A. (1962) 'Bacterial Conjugation', *Annual Review of Microbiology*, 16(1), pp. 289–319. doi: 10.1146/annurev.mi.16.100162.001445.
- Clark, A. J. and Warren, G. J. (1979) 'Conjugal Transmission of Plasmids', *Annual Review of Genetics*, 13(1), pp. 99–125. doi: 10.1146/annurev.ge.13.120179.000531.
- Clarke, M. *et al.* (2008) 'F-pili dynamics by live-cell imaging', 105(46), pp. 17978–17981.
- Click, E. M. and Webster, R. E. (1997) 'Filamentous phage infection: Required interactions with the TolA protein', *Journal of Bacteriology*, 179(20), pp. 6464–6471. doi: 10.1128/jb.179.20.6464-6471.1997.
- Coetsee, J. N., Datta, N. and Hedges, R. W. (1972) 'R factors from *Proteus rettgeri*.', *Journal of general microbiology*, 72(3), pp. 543–52. doi: 10.1099/00221287-72-3-543.
- Cook, S. A. (1971) 'The Complexity of Theorem-Proving Procedures Stephen A. Cook University of Toronto'.

- Costa, T. R. D. *et al.* (2016) 'Structure of the Bacterial Sex F Pilus Reveals an Assembly of a Stoichiometric Protein-Phospholipid Complex', *Cell*. Elsevier Inc., 166(6), pp. 1436-1444.e10. doi: 10.1016/j.cell.2016.08.025.
- Curtiss, R. (1969) 'Bacterial Conjugation', *Annual Review of Microbiology*, 23(1), pp. 69–136. doi: 10.1146/annurev.mi.23.100169.000441.
- Daane, L. L., Molina, J. A. E. and Sadowsky, M. J. (1997) 'Plasmid transfer between spatially separated donor and recipient bacteria in earthworm-containing soil microcosms', *Applied and Environmental Microbiology*, 63(2), pp. 679–686.
- Dagan, T., Artzy-Randrup, Y. and Martin, W. (2008) 'Modular networks and cumulative impact of lateral transfer in prokaryote genome evolution', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(29), pp. 10039–10044. doi: 10.1073/pnas.0800679105.
- Dahlberg, C. and Chao, L. (2003) 'Amelioration of the Cost of Conjugative Plasmid Carriage in Escherichia coli K12', *Genetics*, 165(4), pp. 1641–1649.
- Darmon, E. and Leach, D. R. F. (2014) 'Bacterial Genome Instability', *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 78(1), pp. 1–39. doi: 10.1128/mubr.00035-13.
- Datsenko, K. A. and Wanner, B. L. (2000) 'One-step inactivation of chromosomal genes in Escherichia coli K-12 using PCR products', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(12), pp. 6640–6645. doi: 10.1073/pnas.120163297.
- Datta, N. and Hedges, R. W. (1971) 'Compatibility Groups among fi- R Factors', *Nature*, 234(5326), pp. 222–223. doi: 10.1038/234222a0.
- Datta, N. and Hedges, R. W. (1972) 'Trimethoprim Resistance Conferred by W Plasmids in Enterobacteriaceae', *Journal of General Microbiology*, 72(2), pp. 349–355. doi: 10.1099/00221287-72-2-349.
- Dennis, J. J. (2005) 'The evolution of IncP catabolic plasmids', *Current Opinion in Biotechnology*, 16(3 SPEC. ISS.), pp. 291–298. doi: 10.1016/j.copbio.2005.04.002.
- Dimitriu, T. *et al.* (2014) 'Genetic information transfer promotes cooperation in bacteria', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(30), pp. 11103–11108. doi: 10.1073/pnas.1406840111.
- Dimitriu, T. *et al.* (2019) 'Bacteria from natural populations transfer plasmids mostly towards their kin', *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 286(1905). doi: 10.1098/rspb.2019.1110.
- Dionisio, F. *et al.* (2002) 'Plasmids spread very fast in heterogeneous bacterial communities.', *Genetics*, 162(4), pp. 1525–32. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12524329>.
- Dionisio, F. *et al.* (2005) 'The evolution of a conjugative plasmid and its ability to increase bacterial fitness', *Biology Letters*, 1(2), pp. 250–252. doi: 10.1098/rsbl.2004.0275.
- Dionisio, F., Zilhão, R. and Gama, J. A. (2019) 'Interactions between plasmids and other mobile genetic elements affect their transmission and persistence', *Plasmid*. Elsevier, 102(December 2018), pp. 29–36. doi: 10.1016/j.plasmid.2019.01.003.
- Doolittle, W. F. and Logsdon, J. M. (1998) 'Archaeal genomics: Do archaea have a mixed heritage?', *Current Biology*, 8(6), pp. 209–211.
- Draper, O. *et al.* (2005) 'Site-specific recombinase and integrase activities of a conjugative

- relaxase in recipient cells', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(45), pp. 16385–16390. doi: 10.1073/pnas.0506081102.
- Dröge, M., Pühler, A. and Selbitschka, W. (1999) 'Horizontal gene transfer among bacteria in terrestrial and aquatic habitats as assessed by microcosm and field studies', *Biology and Fertility of Soils*, 29(3), pp. 221–245. doi: 10.1007/s003740050548.
- Durkacz, B. W. and Sherratt, D. J. (1973) 'Segregation kinetics of colicinogenic factor Col E1 from a bacterial population temperature sensitive for DNA polymerase I', *MGG Molecular & General Genetics*, 121(1), pp. 71–75. doi: 10.1007/BF00353694.
- Elhai, J. *et al.* (1997) 'Reduction of conjugal transfer efficiency by three restriction activities of *Anabaena* sp. strain PCC 7120', *Journal of Bacteriology*, 179(6), pp. 1998–2005. doi: 10.1128/jb.179.6.1998-2005.1997.
- Elowitz, Michael B.; Leibler, S. (2000) 'A synthetic oscillatory network repressilator', *Nature*, 403, pp. 335–338. doi: 10.1038/35002125.
- Fang, G., Rocha, E. and Danchin, A. (2005) 'How essential are nonessential genes?', *Molecular Biology and Evolution*, 22(11), pp. 2147–2156. doi: 10.1093/molbev/msi211.
- Fernández-González, E. *et al.* (2011) 'Transfer of R388 derivatives by a pathogenesis-associated type IV secretion system into both bacteria and human cells', *Journal of Bacteriology*, 193(22), pp. 6257–6265. doi: 10.1128/JB.05905-11.
- Fernandez-Lopez, R. *et al.* (2005) 'Unsaturated fatty acids are inhibitors of bacterial conjugation', *Microbiology*, 151(11), pp. 3517–3526. doi: 10.1099/mic.0.28216-0.
- Fernandez-Lopez, R. *et al.* (2014) 'Negative Feedback and Transcriptional Overshooting in a Regulatory Network for Horizontal Gene Transfer', *PLoS Genetics*, 10(2). doi: 10.1371/journal.pgen.1004171.
- Fernández-López, R. *et al.* (2006) 'Dynamics of the IncW genetic backbone imply general trends in conjugative plasmid evolution', *FEMS Microbiology Reviews*, 30(6), pp. 942–966. doi: 10.1111/j.1574-6976.2006.00042.x.
- Fernandez-Lopez, R. and de la Cruz, F. (2014) 'Rebooting the genome: The role of negative feedback in horizontal gene transfer', *Mobile Genetic Elements*, 4(6), pp. 1–6. doi: 10.4161/2159256X.2014.988069.
- Ferrari, M. J. *et al.* (2011) 'Pathogens, social networks, and the paradox of transmission scaling', *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases*, 2011. doi: 10.1155/2011/267049.
- Ferrières, L. *et al.* (2010) 'Silent mischief: Bacteriophage Mu insertions contaminate products of *Escherichia coli* random mutagenesis performed using suicidal transposon delivery plasmids mobilized by broad-host-range RP4 conjugative machinery', *Journal of Bacteriology*, 192(24), pp. 6418–6427. doi: 10.1128/JB.00621-10.
- Fidelma Boyd, E. *et al.* (1996) 'Mosaic structure of plasmids from natural populations of *Escherichia coli*', *Genetics*, 143(3), pp. 1091–1100.
- Fisher, K. W. (1957) 'The nature of the endergonic processes in conjugation in *Escherichia coli* K-12.', *Journal of general microbiology*, 16(1), pp. 136–45. doi: 10.1099/00221287-16-1-136.
- Fox, R. E. *et al.* (2008) 'Spatial structure and nutrients promote invasion of IncP-1 plasmids in bacterial populations', *The ISME Journal*, 2(10), pp. 1024–1039. doi: 10.1038/ismej.2008.53.
- Francia, M. V. *et al.* (2004) 'A classification scheme for mobilization regions of bacterial

- plasmids', *FEMS Microbiology Reviews*, 28(1), pp. 79–100. doi: 10.1016/j.femsre.2003.09.001.
- Freter, R., Freter, R. R. and Brickner, H. (1983) 'Experimental and mathematical models of Escherichia coli plasmid transfer in vitro and in vivo', *Infection and Immunity*, 39(1), pp. 60–84.
- Fronzes, R. *et al.* (2009) 'Structure of a type IV secretion system core complex', *Science*, 323(5911), pp. 266–268. doi: 10.1126/science.1166101.
- Frost, L. S. and Koraimann, G. (2010) 'Regulation of bacterial conjugation: Balancing opportunity with adversity', *Future Microbiology*, 5(7), pp. 1057–1071. doi: 10.2217/fmb.10.70.
- Gama, J. A., Zilhão, R. and Dionisio, F. (2017a) 'Co-resident plasmids travel together', *Plasmid*. Elsevier, 93(April), pp. 24–29. doi: 10.1016/j.plasmid.2017.08.004.
- Gama, J. A., Zilhão, R. and Dionisio, F. (2017b) 'Conjugation efficiency depends on intra and intercellular interactions between distinct plasmids: Plasmids promote the immigration of other plasmids but repress co-colonizing plasmids', *Plasmid*. Elsevier, 93(April), pp. 6–16. doi: 10.1016/j.plasmid.2017.08.003.
- Gama, J. A., Zilhão, R. and Dionisio, F. (2017c) 'Multiple plasmid interference – Pledging allegiance to my enemy's enemy', *Plasmid*. Elsevier, 93(April), pp. 17–23. doi: 10.1016/j.plasmid.2017.08.002.
- Garcillán-Barcia, M. P. *et al.* (2007) 'Conjugative transfer can be inhibited by blocking relaxase activity within recipient cells with intrabodies', *Molecular Microbiology*, 63(2), pp. 404–416. doi: 10.1111/j.1365-2958.2006.05523.x.
- Garcillán-Barcia, M. P., Francia, M. V. and De La Cruz, F. (2009) 'The diversity of conjugative relaxases and its application in plasmid classification', *FEMS Microbiology Reviews*, 33(3), pp. 657–687. doi: 10.1111/j.1574-6976.2009.00168.x.
- Garcillán-Barcia, M. P. and de la Cruz, F. (2008) 'Why is entry exclusion an essential feature of conjugative plasmids?', *Plasmid*, 60(1), pp. 1–18. doi: 10.1016/j.plasmid.2008.03.002.
- Garcillán-Barcia, M. P. and de la Cruz, F. (2013) 'Ordering the bestiary of genetic elements transmissible by conjugation', *Mobile Genetic Elements*, 3(1), p. e24263. doi: 10.4161/mge.24263.
- Gardner, T. S., Cantor, C. R. and Collins, J. J. (2000) 'Construction of a genetic toggle switch in Escherichia coli', *Nature*, 403(6767), pp. 339–342. doi: 10.1038/35002131.
- De Gelder, L. *et al.* (2007) 'Stability of a promiscuous plasmid in different hosts: No guarantee for a long-term relationship', *Microbiology*, 153(2), pp. 452–463. doi: 10.1099/mic.0.2006/001784-0.
- De Gelder, L. *et al.* (2008) 'Adaptive plasmid evolution results in host-range expansion of a broad-host-range plasmid', *Genetics*, 178(4), pp. 2179–2190. doi: 10.1534/genetics.107.084475.
- Getino, M. (2016) 'Control de la conjugación bacteriana'. Available at: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=49628>.
- Getino, M. *et al.* (2017) 'PifC and osa, plasmid weapons against rival conjugative coupling proteins', *Frontiers in Microbiology*, 8(NOV), pp. 1–9. doi: 10.3389/fmicb.2017.02260.
- Getino, M. and de la Cruz, F. (2018) 'Natural and Artificial Strategies To Control the Conjugative Transmission of Plasmids', *Microbiology Spectrum*, 6(1), pp. 1–12. doi:

10.1128/microbiolspec.mtbp-0015-2016.

Ghigo, J. M. (2001) 'Natural conjugative plasmids induce bacterial biofilm development', *Nature*. doi: 10.1038/35086581.

Golub, E., Bailone, A. and Devoret, R. (1988) 'A gene encoding an SOS inhibitor is present in different conjugative plasmids.', *Journal of bacteriology*, 170(9), pp. 4392–4394. doi: 10.1128/jb.170.9.4392-4394.1988.

Gomis-Rüth, F. X. *et al.* (2001) 'The bacterial conjugation protein TrwB resembles ring helicases and F1-atpase', *Nature*, 409(6820), pp. 637–641. doi: 10.1038/35054586.

González-Rivera, C. *et al.* (2019) 'Two pKM101-encoded proteins, the pilus-tip protein TraC and Pep, assemble on the Escherichia coli cell surface as adhesins required for efficient conjugative DNA transfer', *Molecular Microbiology*, 111(1), pp. 96–117. doi: 10.1111/mmi.14141.

Gordon, D. M. (1992) 'Rate of plasmid transfer among Escherichia coli strains isolated from natural populations.', *Journal of general microbiology*, 138(1), pp. 17–21. doi: 10.1099/00221287-138-1-17.

Gordon, G. S. and Wright, A. (2000) 'DNA Segregation in Bacteria', *Annual Review of Microbiology*, 54(1), pp. 681–708. doi: 10.1146/annurev.micro.54.1.681.

Gordon, J. E. *et al.* (2017) 'Use of chimeric type IV secretion systems to define contributions of outer membrane subassemblies for contact-dependent translocation', *Molecular Microbiology*, 105(2), pp. 273–293. doi: 10.1111/mmi.13700.

Goto, N. *et al.* (1984) 'Conduction of nonconjugative plasmids by F' lac is not necessarily associated with transposition of the $\gamma\delta$ sequence', *Journal of Bacteriology*, 159(2), pp. 590–596.

Götz, A. *et al.* (1996) 'Detection and characterization of broad-host-range plasmids in environmental bacteria by PCR.', *Applied and environmental microbiology*, 62(7), pp. 2621–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8779598>.

Grahn, A. M. *et al.* (1997) 'Assembly of a functional phage PRD1 receptor depends on 11 genes of the IncP plasmid mating pair formation complex', *Journal of Bacteriology*, 179(15), pp. 4733–4740. doi: 10.1128/jb.179.15.4733-4740.1997.

Grandoso, G. *et al.* (1994) 'Purification and Biochemical Characterization of TrwC, the Helicase Involved in Plasmid R388 Conjugal DNA Transfer', *European Journal of Biochemistry*, 226(2), pp. 403–412. doi: 10.1111/j.1432-1033.1994.tb20065.x.

Grant, S. G. *et al.* (2006) 'Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into Escherichia coli methylation-restriction mutants.', *Proceedings of the National Academy of Sciences*. doi: 10.1073/pnas.87.12.4645.

Grillot-Courvalin, C. *et al.* (1998) 'Functional gene transfer from intracellular bacteria to mammalian cells.', *Nature biotechnology*, 16(9), pp. 862–6. doi: 10.1038/nbt0998-862.

Grohmann, E. *et al.* (2018) 'Type IV secretion in Gram-negative and Gram-positive bacteria', *Molecular Microbiology*, 107(4), pp. 455–471. doi: 10.1111/mmi.13896.

Guasch, A. *et al.* (2003) 'Recognition and processing of the origin of transfer DNA by conjugative relaxase TrwC', *Nature Structural Biology*, 10(12), pp. 1002–1010. doi: 10.1038/nsb1017.

Guglielmini, J., De La Cruz, F. and Rocha, E. P. C. (2013) 'Evolution of conjugation and type IV

- secretion systems', *Molecular Biology and Evolution*, 30(2), pp. 315–331. doi: 10.1093/molbev/mss221.
- Gutiérrez Pescarmona, M. E. (2017) 'A new agent-based platform for simulating multicellular biocircuits with conjugative plasmids'. doi: 10.20868/UPM.thesis.48812.
- Guyenet, C. *et al.* (2011) 'The stb operon balances the requirements for vegetative stability and conjugative transfer of plasmid R388', *PLoS Genetics*, 7(5). doi: 10.1371/journal.pgen.1002073.
- Guzman, L. M. *et al.* (1995) 'Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose PBAD promoter.', *Journal of bacteriology*, 177(14), pp. 4121–30. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7608087> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC177145>.
- Haagensen, J. A. J. *et al.* (2002) 'In situ detection of horizontal transfer of mobile genetic elements', *FEMS Microbiology Ecology*, 42(2), pp. 261–268. doi: 10.1016/S0168-6496(02)00369-0.
- Haft, R. J. F., Mittler, J. E. and Traxler, B. (2009) 'Competition favours reduced cost of plasmids to host bacteria', *ISME Journal*. Nature Publishing Group, 3(7), pp. 761–769. doi: 10.1038/ismej.2009.22.
- Hall-Stoodley, L., Costerton, J. W. and Stoodley, P. (2004) 'Bacterial biofilms: from the Natural environment to infectious diseases', *Nature Reviews Microbiology*, 2(2), pp. 95–108. doi: 10.1038/nrmicro821.
- Hall, J. P. J. *et al.* (2016) 'Source-sink plasmid transfer dynamics maintain gene mobility in soil bacterial communities', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(29), pp. 8260–8265. doi: 10.1073/pnas.1600974113.
- Harmer, C. J. and Hall, R. M. (2015) 'The A to Z of A/C plasmids', *Plasmid*, 80, pp. 63–82. doi: 10.1016/j.plasmid.2015.04.003.
- Harrington, L. C. and Rogerson, A. C. (1990) 'The F pilus of Escherichia coli appears to support stable DNA transfer in the absence of wall-to-wall contact between cells', *Journal of Bacteriology*, 172(12), pp. 7263–7264. doi: 10.1128/jb.172.12.7263-7264.1990.
- Harrison, E., Jamie Wood, A., *et al.* (2015) 'Bacteriophages limit the existence conditions for conjugative plasmids', *mBio*, 6(3), pp. 1–9. doi: 10.1128/mBio.00586-15.
- Harrison, E., Guymer, D., *et al.* (2015) 'Parallel Compensatory Evolution Stabilizes Plasmids across the Parasitism-Mutualism Continuum', *Current Biology*. The Authors, 25(15), pp. 2034–2039. doi: 10.1016/j.cub.2015.06.024.
- Harrison, E. and Brockhurst, M. A. (2012) 'Plasmid-mediated horizontal gene transfer is a coevolutionary process', *Trends in Microbiology*, 20(6), pp. 262–267. doi: 10.1016/j.tim.2012.04.003.
- Harrison, P. W. *et al.* (2010) 'Introducing the bacterial "chromid": Not a chromosome, not a plasmid', *Trends in Microbiology*, 18(4), pp. 141–148. doi: 10.1016/j.tim.2009.12.010.
- Hashimoto, T. and Sekiguchi, M. (1976) 'Isolation of temperature sensitive mutants of R plasmid by in vitro mutagenesis with hydroxylamine', *Journal of Bacteriology*, 127(3), pp. 1561–1563.
- Hausner, M. and Wuertz, S. (1999) 'High rates of conjugation in bacterial biofilms as

- determined by quantitative in situ analysis.', *Applied and environmental microbiology*, 65(8), pp. 3710–3. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10427070>.
- Hayes, F. (2003) 'Toxins-antitoxins: Plasmid maintenance, programmed cell death, and cell cycle arrest', *Science*, 301(5639), pp. 1496–1499. doi: 10.1126/science.1088157.
- Heuer, H., Fox, R. E. and Top, E. M. (2007) 'Frequent conjugative transfer accelerates adaptation of a broad-host-range plasmid to an unfavorable *Pseudomonas putida* host', *FEMS Microbiology Ecology*, 59(3), pp. 738–748. doi: 10.1111/j.1574-6941.2006.00223.x.
- Hinnebusch, J. and Tilly, K. (1993) 'Linear plasmids and chromosomes in bacteria', *Molecular Microbiology*, 10(5), pp. 917–922. doi: 10.1111/j.1365-2958.1993.tb00963.x.
- Ho, T. Q. *et al.* (2002) 'Compatible bacterial plasmids are targeted to independent cellular locations in *Escherichia coli*', *EMBO Journal*, 21(7), pp. 1864–1872. doi: 10.1093/emboj/21.7.1864.
- Höppner, C. *et al.* (2005) 'The putative lytic transglycosylase VirB1 from *Brucella suis* interacts with the type IV secretion system core components VirB8, VirB9 and VirB11', *Microbiology*, 151(11), pp. 3469–3482. doi: 10.1099/mic.0.28326-0.
- Hormaeche, I. *et al.* (2002) 'Purification and properties of TrwB, a hexameric, ATP-binding integral membrane protein essential for R388 plasmid conjugation', *Journal of Biological Chemistry*, 277(48), pp. 46456–46462. doi: 10.1074/jbc.M207250200.
- Hughes, J. M. *et al.* (2012) 'The role of clonal interference in the evolutionary dynamics of plasmid-host adaptation', *mBio*, 3(4), pp. 1–8. doi: 10.1128/mBio.00077-12.
- Humphrey, B. *et al.* (2012) 'Fitness of *Escherichia coli* strains carrying expressed and partially silent IncN and IncP1 plasmids', *BMC Microbiology*, 12. doi: 10.1186/1471-2180-12-53.
- Ilhan, J. *et al.* (2019) 'Segregational Drift and the Interplay between Plasmid Copy Number and Evolvability', *Molecular Biology and Evolution*, 36(3), pp. 472–486. doi: 10.1093/molbev/msy225.
- Inuzuka, M. and Helinski, D. R. (1978) 'Replication of Antibiotic Resistance Plasmid R6K DNA in Vitro', *Biochemistry*, 17(13), pp. 2567–2573. doi: 10.1021/bi00606a017.
- Jacquioud, S. *et al.* (2017) 'Deciphering conjugative plasmid permissiveness in wastewater microbiomes', *Molecular Ecology*, 26(13), pp. 3556–3571. doi: 10.1111/mec.14138.
- Jaffe, A., Ogura, T. and Hiraga, S. (1985) 'Effects of the ccd Function of the F Plasmid', *Journal of Bacteriology*, 163(3), pp. 841–849.
- Jain, A. and Srivastava, P. (2013) 'Broad host range plasmids', *FEMS Microbiology Letters*, 348(2), pp. 87–96. doi: 10.1111/1574-6968.12241.
- Jain, R., Rivera, M. C. and Lake, J. A. (1999) 'Horizontal gene transfer among genomes: the complexity hypothesis.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(7), pp. 3801–6. doi: 10.1073/pnas.96.7.3801.
- Johnson, C. M. and Grossman, A. D. (2015) 'Integrative and Conjugative Elements (ICEs): What They Do and How They Work.', *Annual review of genetics*, 49, pp. 577–601. doi: 10.1146/annurev-genet-112414-055018.
- de Jong, M. C. M. (1995) 'Mathematical modelling in veterinary epidemiology: why model building is important', *Preventive Veterinary Medicine*, 25(2), pp. 183–193. doi: 10.1016/0167-5877(95)00538-2.

- Kado, C. I. (1998) 'Origin and evolution of plasmids', *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 73(1), pp. 117–126. doi: 10.1023/A:1000652513822.
- Kamruzzaman, M. *et al.* (2017) 'Plasmid interference for curing antibiotic resistance plasmids in vivo', *PLoS ONE*, 12(2), pp. 1–20. doi: 10.1371/journal.pone.0172913.
- Khlebnikov, A. *et al.* (2000) 'Regulatable arabinose-inducible gene expression system with consistent control in all cells of a culture', *Journal of Bacteriology*, 182(24), pp. 7029–7034. doi: 10.1128/JB.182.24.7029-7034.2000.
- Khlebnikov, A. *et al.* (2001) 'Homogeneous expression of the P(BAD) promoter in Escherichia coli by constitutive expression of the low-affinity high-capacity AraE transporter.', *Microbiology (Reading, England)*, 147(Pt 12), pp. 3241–7. doi: 10.1099/00221287-147-12-3241.
- Klemm, E. J., Wong, V. K. and Dougan, G. (2018) 'Emergence of dominant multidrug-resistant bacterial clades: Lessons from history and whole-genome sequencing', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(51), pp. 12872–12877. doi: 10.1073/pnas.1717162115.
- Kloesges, T. *et al.* (2011) 'Networks of gene sharing among 329 proteobacterial genomes reveal differences in lateral gene transfer frequency at different phylogenetic depths', *Molecular Biology and Evolution*, 28(2), pp. 1057–1074. doi: 10.1093/molbev/msq297.
- Klümper, U. *et al.* (2015) 'Broad host range plasmids can invade an unexpectedly diverse fraction of a soil bacterial community', *ISME Journal*, 9, pp. 934–945. doi: 10.1038/ismej.2014.191.
- Kneis, D., Hiltunen, T. and Heß, S. (2019) 'A high-throughput approach to the culture-based estimation of plasmid transfer rates', *Plasmid*. Elsevier, 101(October 2018), pp. 28–34. doi: 10.1016/j.plasmid.2018.12.003.
- Knudsen, G. R. *et al.* (1988) 'Predictive model of conjugative plasmid transfer in the rhizosphere and phyllosphere.', *Applied and environmental microbiology*, 54(2), pp. 343–347.
- Koraimann, G. and Wagner, M. A. (2014) 'Social behavior and decision making in bacterial conjugation', *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 4(APR), pp. 1–7. doi: 10.3389/fcimb.2014.00054.
- Kottara, A. *et al.* (2018) 'Variable plasmid fitness effects and mobile genetic element dynamics across Pseudomonas species', *FEMS Microbiology Ecology*, 94(1), pp. 1–7. doi: 10.1093/femsec/fix172.
- Król, J. E. *et al.* (2013) 'Invasion of E. coli biofilms by antibiotic resistance plasmids', *Plasmid*, 70(1), pp. 110–119. doi: 10.1016/j.plasmid.2013.03.003.
- Krone, S. M. *et al.* (2007) 'Modelling the spatial dynamics of plasmid transfer and persistence', *Microbiology*, 153(8), pp. 2803–2816. doi: 10.1099/mic.0.2006/004531-0.
- de la Cruz, F. and Davies, J. (2000) 'Horizontal gene transfer and the origin of species: lessons from bacteria.', *Trends in microbiology*, 8(3), pp. 128–33. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10707066>.
- Lacroix, B. and Citovsky, V. (2011) 'Extracellular VirB5 enhances T-DNA transfer from agrobacterium to the host plant', *PLoS ONE*, 6(10). doi: 10.1371/journal.pone.0025578.

- Lagido, C. *et al.* (2003) 'A model for bacterial conjugal gene transfer on solid surfaces', *FEMS Microbiology Ecology*, 44(1), pp. 67–78. doi: 10.1016/S0168-6496(02)00453-1.
- Lambertsen, L. M. *et al.* (2004) 'Transcriptional regulation of pWW0 transfer genes in *Pseudomonas putida* KT2440', *Plasmid*, 52(3), pp. 169–181. doi: 10.1016/j.plasmid.2004.06.005.
- Langer, P. J., Shanabruch, W. G. and Walker, G. C. (1981) 'Functional organization of plasmid pKM101', *Journal of Bacteriology*, 145(3), pp. 1310–1316.
- Lanza, V. F. *et al.* (2014) 'Plasmid Flux in *Escherichia coli* ST131 Sublineages, Analyzed by Plasmid Constellation Network (PLACNET), a New Method for Plasmid Reconstruction from Whole Genome Sequences', *PLoS Genetics*, 10(12). doi: 10.1371/journal.pgen.1004766.
- Larrea, D. *et al.* (2013) 'Structural independence of conjugative coupling protein TrwB from its Type IV secretion machinery', *Plasmid*. Elsevier Inc., 70(1), pp. 146–153. doi: 10.1016/j.plasmid.2013.03.006.
- Lauritsen, I. *et al.* (2017) 'A versatile one-step CRISPR-Cas9 based approach to plasmid-curing', *Microbial Cell Factories*. BioMed Central, 16(1), pp. 1–10. doi: 10.1186/s12934-017-0748-z.
- Lawley, T. D. *et al.* (2002) 'Bacterial conjugative transfer: Visualization of successful mating pairs and plasmid establishment in live *Escherichia coli*', *Molecular Microbiology*, 44(4), pp. 947–956. doi: 10.1046/j.1365-2958.2002.02938.x.
- Lawrence, J. G., Ochman, H. and Selander, R. K. (1998) 'Molecular archaeology of the *Escherichia coli* genome', *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 95(August), pp. 9413–9417. Available at: <http://www.pnas.org/content/pnas/95/16/9413.full.pdf>.
- LEDERBERG, J. and TATUM, E. L. (1946) 'Gene Recombination in *Escherichia Coli*', *Nature*, 158(4016), pp. 558–558. doi: 10.1038/158558a0.
- Levin, B. R. and Stewart, F. M. (1980) 'The population biology of bacterial plasmids: a priori conditions for the existence of mobilizable nonconjugative factors.', *Genetics*, 94(2), pp. 425–43. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6248416>.
- Levin, B. R., Stewart, F. M. and Rice, V. A. (1979) 'The kinetics of conjugative plasmid transmission: Fit of a simple mass action model', *Plasmid*, 2(2), pp. 247–260. doi: 10.1016/0147-619X(79)90043-X.
- Li, C. *et al.* (2018) 'Frequency Modulation of Transcriptional Bursting Enables Sensitive and Rapid Gene Regulation', *Cell Systems*, 6(4), pp. 409–423.e11. doi: 10.1016/j.cels.2018.01.012.
- Li, L. *et al.* (2019) 'The genetic structures of an extensively drug resistant (XDR) *Klebsiella pneumoniae* and its plasmids', *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 9(JAN), pp. 1–11. doi: 10.3389/fcimb.2018.00446.
- Licht, T. R. *et al.* (1999) 'Plasmid transfer in the animal intestine and other dynamic bacterial populations: The role of community structure and environment', *Microbiology*, 145(9), pp. 2615–2622. doi: 10.1099/00221287-145-9-2615.
- Lilley, A. K. and Bailey, M. J. (2002) 'The transfer dynamics of *Pseudomonas* sp. plasmid pQBR11 in biofilms', *FEMS Microbiology Ecology*, 42(2), pp. 243–250. doi: 10.1016/S0168-6496(02)00371-9.
- Lilly, J. and Camps, M. (2015) 'Mechanisms of Theta Plasmid Replication.', *Microbiology spectrum*, 3(1), p. PLAS-0029-2014. doi: 10.1128/microbiolspec.PLAS-0029-2014.

- Lipton, R. J. (1995) 'DNA solution of hard computational problems', *Science*, 268(5210), pp. 542–545. doi: 10.1126/science.7725098.
- Llosa, M. *et al.* (2002) 'Bacterial conjugation: A two-step mechanism for DNA transport', *Molecular Microbiology*, 45(1), pp. 1–8. doi: 10.1046/j.1365-2958.2002.03014.x.
- Llosa, M., Bolland, S. and de la Cruz, F. (1991) 'Structural and functional analysis of the origin of conjugal transfer of the broad-host-range IncW plasmid R388 and comparison with the related IncN plasmid R46', *MGG Molecular & General Genetics*, 226(3), pp. 473–483. doi: 10.1007/BF00260661.
- Llosa, M., Grandoso, G. and Cruz, F. de la (1995) 'Nicking Activity of TrwC Directed Against the Origin of Transfer of the IncW Plasmid R388', *Journal of Molecular Biology*, 246(1), pp. 54–62. doi: 10.1006/jmbi.1994.0065.
- Llosa, M. and O'Callaghan, D. (2004) 'Euroconference on the Biology of Type IV Secretion Processes: Bacterial gates into the outer world', *Molecular Microbiology*, 53(1), pp. 1–8. doi: 10.1111/j.1365-2958.2004.04168.x.
- Llosa, M., Roy, C. and Dehio, C. (2009) 'Bacterial type IV secretion systems in human disease', *Molecular Microbiology*, 73(2), pp. 141–151. doi: 10.1111/j.1365-2958.2009.06751.x.
- Llosa, M., Zunzunegui, S. and de la Cruz, F. (2003) 'Conjugative coupling proteins interact with cognate and heterologous VirB10-like proteins while exhibiting specificity for cognate relaxosomes', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(18), pp. 10465–10470. doi: 10.1073/pnas.1830264100.
- Loftie-Eaton, W. *et al.* (2016) 'Evolutionary paths that expand plasmid host-range: Implications for spread of antibiotic resistance', *Molecular Biology and Evolution*, 33(4), pp. 885–897. doi: 10.1093/molbev/msv339.
- Lopatkin, A. J. *et al.* (2017) 'Persistence and reversal of plasmid-mediated antibiotic resistance', *Nature Communications*. Springer US, 8(1). doi: 10.1038/s41467-017-01532-1.
- Low, H. H. *et al.* (2014) 'Structure of a type IV secretion system.', *Nature*, 508(7497), pp. 550–553. doi: 10.1038/nature13081.
- Lundquist, P. D. and Levin, B. R. (1986) 'Transitory derepression and the maintenance of conjugative plasmids.', *Genetics*, 113(3), pp. 483–497.
- MacDonald, J. A., Smets, B. F. and Rittmann, B. E. (1992) 'The effects of energy availability on the conjugative-transfer kinetics of plasmid RP4', *Water Research*, 26(4), pp. 461–468. doi: 10.1016/0043-1354(92)90046-7.
- Madsen, J. S. *et al.* (2012) 'The interconnection between biofilm formation and horizontal gene transfer', *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 65(2), pp. 183–195. doi: 10.1111/j.1574-695X.2012.00960.x.
- Marshall, B. M. and Levy, S. B. (2011) 'Food animals and antimicrobials: Impacts on human health', *Clinical Microbiology Reviews*, 24(4), pp. 718–733. doi: 10.1128/CMR.00002-11.
- Martinez, E. and de la Cruz, F. (1988) 'Transposon Tn 21 encodes a RecA-independent site-specific integration system', *MGG Molecular & General Genetics*. doi: 10.1007/BF00330610.
- Marvin, D. (1998) 'Filamentous phage structure, infection and assembly', *Current Opinion in Structural Biology*, 8(2), pp. 150–158. doi: 10.1016/S0959-440X(98)80032-8.
- May, R. M. and Anderson, R. M. (1979) 'Population biology of infectious diseases: Part II',

Nature, 280(9), pp. 455–461.

Medema, M. H. *et al.* (2010) 'The sequence of a 1.8-Mb bacterial linear plasmid reveals a rich evolutionary reservoir of secondary metabolic pathways', *Genome Biology and Evolution*, 2(1), pp. 212–224. doi: 10.1093/gbe/evq013.

Van der Meer, J. R. *et al.* (1992) 'Molecular mechanisms of genetic adaptation to xenobiotic compounds', *Microbiological Reviews*, 56(4), pp. 677–694.

Meinke, G. *et al.* (2016) 'Cre Recombinase and Other Tyrosine Recombinases', *Chemical Reviews*, 116(20), pp. 12785–12820. doi: 10.1021/acs.chemrev.6b00077.

Meng, R. *et al.* (2019) 'Structural basis for the adsorption of a single-stranded RNA bacteriophage', *Nature Communications*, 10(1). doi: 10.1038/s41467-019-11126-8.

Merkey, B. V. *et al.* (2011) 'Growth dependence of conjugation explains limited plasmid invasion in biofilms: An individual-based modelling study', *Environmental Microbiology*, 13(9), pp. 2435–2452. doi: 10.1111/j.1462-2920.2011.02535.x.

Meyer, R. J. and Shapiro, J. A. (1980) 'Genetic organization of the broad-host-range incP-1 plasmid R751', *Journal of Bacteriology*, 143(3), pp. 1362–1373.

Meynell, E. and Datta, N. (1967) 'Mutant drug resistant factors of high transmissibility', *Nature*. doi: 10.1038/214885a0.

Meynell, E., Meynell, G. G. and Datta, N. (1968) 'Phylogenetic relationships of drug-resistance factors and other transmissible bacterial plasmids.', *Bacteriological reviews*, 32(1), pp. 55–83.

Millan, A. S. *et al.* (2014) 'Positive selection and compensatory adaptation interact to stabilize non-transmissible plasmids', *Nature Communications*, 5, pp. 1–11. doi: 10.1038/ncomms6208.

Mirkin, B. G. *et al.* (2003) 'Algorithms for computing parsimonious evolutionary scenarios for genome evolution, the last universal common ancestor and dominance of horizontal gene transfer in the evolution of prokaryotes', *BMC Evolutionary Biology*, 3, pp. 1–34. doi: 10.1186/1471-2148-3-2.

Modi, R. I. *et al.* (1991) 'Plasmid macro-evolution: selection of deletions during adaptation in a nutrient-limited environment', *Genetica*, 84(3), pp. 195–202. doi: 10.1007/BF00127247.

Modi, R. I. and Adams, J. (1991) 'COEVOLUTION IN BACTERIAL-PLASMID POPULATIONS', *Evolution*, 45(3), pp. 656–667. doi: 10.1111/j.1558-5646.1991.tb04336.x.

Molin, S. and Tolker-Nielsen, T. (2003) 'Gene transfer occurs with enhanced efficiency in biofilms and induces enhanced stabilisation of the biofilm structure', *Current Opinion in Biotechnology*, 14(3), pp. 255–261. doi: 10.1016/S0958-1669(03)00036-3.

Moncalián, G. *et al.* (1997) 'OriT-processing and regulatory roles of TrwA protein in plasmid R388 conjugation', *Journal of Molecular Biology*, 270(2), pp. 188–200. doi: 10.1006/jmbi.1997.1082.

Moncalián, G. *et al.* (1999) 'IHF protein inhibits cleavage but not assembly of plasmid R388 relaxosomes', *Molecular Microbiology*, 31(6), pp. 1643–1652. doi: 10.1046/j.1365-2958.1999.01288.x.

Moncalián, G. and De La Cruz, F. (2004) 'DNA binding properties of protein TrwA, a possible structural variant of the Arc repressor superfamily', *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*, 1701(1–2), pp. 15–23. doi: 10.1016/j.bbapap.2004.05.009.

- Moran, R. A. and Hall, R. M. (2017) 'Analysis of pCERC7, a small antibiotic resistance plasmid from a commensal ST131 *Escherichia coli*, defines a diverse group of plasmids that include various segments adjacent to a multimer resolution site and encode the same NikA relaxase accessory protein enabling mobilisation', *Plasmid*. Elsevier Inc., 89, pp. 42–48. doi: 10.1016/j.plasmid.2016.11.001.
- Moré, M. I., Pohlman, R. F. and Winans, S. C. (1996) 'Genes encoding the pKM101 conjugal mating pore are negatively regulated by the plasmid-encoded KorA and KorB proteins', *Journal of Bacteriology*, 178(15), pp. 4392–4399. doi: 10.1128/jb.178.15.4392-4399.1996.
- Morzejko, E., Panek, E. and Cebrat, S. (1990) 'Conjugational cotransfer of IncFI and IncI conjugative plasmids forming aggregate in a pathogenic *Citrobacter freundii* strain', *FEMS Microbiology Letters*, 68(1–2), pp. 7–11. doi: 10.1016/0378-1097(90)90115-7.
- Mötsch, S. *et al.* (1985) 'Junction sequences generated by "one-ended transposition"', *Nucleic Acids Research*, 13(9), pp. 3335–3342. doi: 10.1093/nar/13.9.3335.
- Nelson, K. E. *et al.* (1999) 'Evidence for lateral gene transfer between archaea and bacteria from genome sequence of *Thermotoga maritima*', *Nature*, 399(6734), pp. 323–329. doi: 10.1038/20601.
- Nogueira, T. *et al.* (2009) 'Horizontal Gene Transfer of the Secretome Drives the Evolution of Bacterial Cooperation and Virulence', *Current Biology*, 19(20), pp. 1683–1691. doi: 10.1016/j.cub.2009.08.056.
- Norberg, P. *et al.* (2011) 'The IncP-1 plasmid backbone adapts to different host bacterial species and evolves through homologous recombination', *Nature Communications*, 2(1). doi: 10.1038/ncomms1267.
- Nordstrom, K. (1989) 'Mechanisms That Contribute To The Stable Segregation Of Plasmids', *Annual Review of Genetics*, 23(1), pp. 37–69. doi: 10.1146/annurev.genet.23.1.37.
- Nordström, K. and Gerdes, K. (2003) 'Clustering versus random segregation of plasmids lacking a partitioning function: A plasmid paradox?', *Plasmid*, 50(2), pp. 95–101. doi: 10.1016/S0147-619X(03)00056-8.
- Nordström, K. and Uhlin, B. E. (1992) 'Runaway-replication plasmids as tools to produce large quantities of proteins from cloned genes in bacteria.', *Bio/technology (Nature Publishing Company)*, 10(6), pp. 661–6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1368887>.
- Norman, A., Hansen, L. H. and Sørensen, S. J. (2009) 'Conjugative plasmids: Vessels of the communal gene pool', *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 364(1527), pp. 2275–2289. doi: 10.1098/rstb.2009.0037.
- Normander, B. *et al.* (1998) 'Effect of bacterial distribution and activity on conjugal gene transfer on the phylloplane of the bush bean (*Phaseolus vulgaris*)', *Applied and Environmental Microbiology*, 64(5), pp. 1902–1909.
- Novick, R. P. (1987) 'Plasmid incompatibility.', *Microbiological Reviews*, 51(4), pp. 381 LP – 395. Available at: <http://mmbr.asm.org/content/51/4/381.abstract>.
- Ochman, Howard, Lawrence, Jeffrey G. and Groisman, Eduardo A. (2000) 'Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation', *Nature*, 405(6784), pp. 299–304. Available at: <http://adsabs.harvard.edu/abs/2000Natur.405..299O>.
- Olsen, R. H. and Shipley, P. L. (1975) 'RP1 properties and fertility inhibition among P, N, W, and X incompatibility group plasmids.', *Journal of Bacteriology*, 123(1), pp. 28–35.

- Olsen, R. H., Siak, J. S. and Gray, R. H. (1974) 'Characteristics of PRD1, a plasmid-dependent broad host range DNA bacteriophage.', *Journal of virology*, 14(3), pp. 689–99. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4211861><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC355564>.
- Orlek, A. *et al.* (2017) 'Ordering the mob: Insights into replicon and MOB typing schemes from analysis of a curated dataset of publicly available plasmids', *Plasmid*. The Authors, 91, pp. 42–52. doi: 10.1016/j.plasmid.2017.03.002.
- van Passel, M. W. J. *et al.* (2006) 'Compositional discordance between prokaryotic plasmids and host chromosomes', *BMC Genomics*, 7(February). doi: 10.1186/1471-2164-7-26.
- de Paz, H. D. *et al.* (2005) 'Functional interactions between type IV secretion systems involved in DNA transfer and virulence', *Microbiology*, 151(11), pp. 3505–3516. doi: 10.1099/mic.0.28410-0.
- Peña-Miller, R. *et al.* (2015) 'Evaluating the effect of horizontal transmission on the stability of plasmids under different selection regimes', *Mobile Genetic Elements*, 5(3), pp. 29–33. doi: 10.1080/2159256X.2015.1045115.
- Peña, A. *et al.* (2012) 'The hexameric structure of a conjugative VirB4 protein ATPase provides new insights for a functional and phylogenetic relationship with DNA translocases', *Journal of Biological Chemistry*, 287(47), pp. 39925–39932. doi: 10.1074/jbc.M112.413849.
- Pinedo, C. A. and Smets, B. F. (2005) 'Conjugal TOL transfer from *Pseudomonas putida* to *Pseudomonas aeruginosa*: Effects of restriction proficiency, toxicant exposure, cell density ratios, and conjugation detection method on observed transfer efficiencies', *Applied and Environmental Microbiology*, 71(1), pp. 51–57. doi: 10.1128/AEM.71.1.51-57.2005.
- Pinilla-Redondo, R. *et al.* (2018) 'Monitoring plasmid-mediated horizontal gene transfer in microbiomes: recent advances and future perspectives', *Plasmid*. Elsevier Inc, 99, pp. 56–67. doi: 10.1016/j.plasmid.2018.08.002.
- Platt, R. *et al.* (2000) 'Genetic system for reversible integration of DNA constructs and lacZ gene fusions into the *Escherichia coli* chromosome', *Plasmid*, 43(1), pp. 12–23. doi: 10.1006/plas.1999.1433.
- Pogliano, J. *et al.* (2001) 'Multicopy plasmids are clustered and localized in *Escherichia coli*', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(8), pp. 4486–4491. doi: 10.1073/pnas.081075798.
- Pogliano, J. (2002) 'Dynamic cellular location of bacterial plasmids', *Current Opinion in Microbiology*, 5(6), pp. 586–590. doi: 10.1016/S1369-5274(02)00370-3.
- Pözlleitner, E. *et al.* (1997) 'TraM of plasmid R1 controls transfer gene expression as an integrated control element in a complex regulatory network', *Molecular Microbiology*, 25(3), pp. 495–507. doi: 10.1046/j.1365-2958.1997.4831853.x.
- Popa, O. and Dagan, T. (2011) 'Trends and barriers to lateral gene transfer in prokaryotes', *Current Opinion in Microbiology*. Elsevier Ltd, 14(5), pp. 615–623. doi: 10.1016/j.mib.2011.07.027.
- Porse, A. *et al.* (2016) 'Survival and Evolution of a Large Multidrug Resistance Plasmid in New Clinical Bacterial Hosts', *Molecular Biology and Evolution*, 33(11), pp. 2860–2873. doi: 10.1093/molbev/msw163.
- Pósfai, G. *et al.* (2006) 'Emergent properties of reduced-genome *Escherichia coli*', *Science*,

312(5776), pp. 1044–1046. doi: 10.1126/science.1126439.

Pun, G. and Rozenberg, G. (2002) 'A guide to membrane computing', *Theoretical Computer Science*, 287(1), pp. 73–100. doi: 10.1016/S0304-3975(02)00136-6.

Rabani, M. *et al.* (2014) 'High-resolution sequencing and modeling identifies distinct dynamic RNA regulatory strategies', *Cell*. Elsevier Inc., 159(7), pp. 1698–1710. doi: 10.1016/j.cell.2014.11.015.

Ramsay, J. P. and Firth, N. (2017) 'Diverse mobilization strategies facilitate transfer of non-conjugative mobile genetic elements', *Current Opinion in Microbiology*. Elsevier Ltd, 38, pp. 1–9. doi: 10.1016/j.mib.2017.03.003.

Rankin, D. J., Rocha, E. P. C. and Brown, S. P. (2011) 'What traits are carried on mobile genetic elements, and why', *Heredity*. Nature Publishing Group, 106(1), pp. 1–10. doi: 10.1038/hdy.2010.24.

Reisner, A., Molin, S. and Zechner, E. L. (2002) 'Recombinogenic engineering of conjugative plasmids with fluorescent marker cassettes', *FEMS Microbiology Ecology*, 42(2), pp. 251–259. doi: 10.1016/S0168-6496(02)00343-4.

Reisner, A., Wolinski, H. and Zechner, E. L. (2012) 'In situ monitoring of IncF plasmid transfer on semi-solid agar surfaces reveals a limited invasion of plasmids in recipient colonies', *Plasmid*. Elsevier Inc., 67(2), pp. 155–161. doi: 10.1016/j.plasmid.2012.01.001.

Revilla, C. *et al.* (2008) 'Different pathways to acquiring resistance genes illustrated by the recent evolution of IncW plasmids', *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52(4), pp. 1472–1480. doi: 10.1128/AAC.00982-07.

Reyes-Lamothe, R. *et al.* (2014) 'High-copy bacterial plasmids diffuse in the nucleoid-free space, replicate stochastically and are randomly partitioned at cell division', *Nucleic Acids Research*, 42(2), pp. 1042–1051. doi: 10.1093/nar/gkt918.

Rice, P. A. (2015) 'Serine Resolvases.', *Microbiology spectrum*. American Society of Microbiology, 3(2), pp. MDNA3-0045–2014. doi: 10.1128/microbiolspec.MDNA3-0045-2014.

Richaume, A., Angle, J. S. and Sadowsky, M. J. (1989) 'Influence of soil variables on in situ plasmid transfer from *Escherichia coli* to *Rhizobium fredii*.', *Applied and environmental microbiology*, 55(7), pp. 1730–1734.

Riede, I. and Eschbach, M. L. (1986) 'Evidence that TraT interacts with OmpA of *Escherichia coli*', *FEBS Letters*, 205(2), pp. 241–245. doi: 10.1016/0014-5793(86)80905-X.

Ripoll-Rozada, J. *et al.* (2013) 'Functional Interactions of VirB11 Traffic ATPases with VirB4 and VirD4 Molecular Motors in Type IV Secretion Systems', *Journal of Bacteriology*, 195(18), pp. 4195–4201. doi: 10.1128/JB.00437-13.

Ripoll-Rozada, J. *et al.* (2016) 'Type IV traffic ATPase TrwD as molecular target to inhibit bacterial conjugation', *Molecular Microbiology*, 100(5), pp. 912–921. doi: 10.1111/mmi.13359.

Rivera-Calzada, A. *et al.* (2013) 'Structure of a bacterial type IV secretion core complex at subnanometre resolution', *EMBO Journal*, 32(8), pp. 1195–1204. doi: 10.1038/emboj.2013.58.

Rodriguez-Beltran, J. *et al.* (2018) 'Multicopy plasmids allow bacteria to escape from fitness trade-offs during evolutionary innovation', *Nature Ecology and Evolution*, 2(5), pp. 873–881. doi: 10.1038/s41559-018-0529-z.

Rotman, E. and Seifert, H. S. (2014) 'The Genetics of *Neisseria* Species', *Annual Review of*

- Genetics*, 48(1), pp. 405–431. doi: 10.1146/annurev-genet-120213-092007.
- Rozen, D. E., McGrew, S. and Ellington, A. D. (1996) 'Molecular computing: Does DNA compute?', *Current Biology*, 6(3), pp. 254–257. doi: 10.1016/S0960-9822(02)00471-2.
- Ruiz-Masó, J. A. *et al.* (2015) 'Plasmid Rolling-Circle Replication.', *Microbiology spectrum*, 3(1), p. PLAS-0035-2014. doi: 10.1128/microbiolspec.PLAS-0035-2014.
- Ruiz, R., de la Cruz, F. and Fernandez-Lopez, R. (2018) 'Negative feedback increases information transmission, enabling bacteria to discriminate sublethal antibiotic concentrations', *Science Advances*, 4(11), pp. 1–11. doi: 10.1126/sciadv.aat5771.
- Sagai, H., Uyobe, S. and Mitsuhashi, S. (1977) 'Inhibition and facilitation of transfer among *Pseudomonas aeruginosa* R plasmids.', *Journal of bacteriology*, 131(3), pp. 765–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/408326>.
- Sagulenko, E. *et al.* (2001) 'Role of *Agrobacterium* VirB11 ATPase in T-pilus assembly and substrate selection', *Journal of Bacteriology*, 183(20), pp. 5813–5825. doi: 10.1128/JB.183.20.5813-5825.2001.
- Salema, V. *et al.* (2013) 'Selection of Single Domain Antibodies from Immune Libraries Displayed on the Surface of *E. coli* Cells with Two β -Domains of Opposite Topologies', *PLoS ONE*, 8(9), pp. 1–18. doi: 10.1371/journal.pone.0075126.
- Salema, V. and Fernández, L. Á. (2017) 'Escherichia coli surface display for the selection of nanobodies', *Microbial Biotechnology*, 10(6), pp. 1468–1484. doi: 10.1111/1751-7915.12819.
- Sampei, G. *et al.* (2010) 'Complete genome sequence of the incompatibility group I1 plasmid R64', *Plasmid*. Elsevier Inc., 64(2), pp. 92–103. doi: 10.1016/j.plasmid.2010.05.005.
- San Millan, A. (2018) 'Evolution of Plasmid-Mediated Antibiotic Resistance in the Clinical Context', *Trends in Microbiology*. Elsevier Ltd, 26(12), pp. 978–985. doi: 10.1016/j.tim.2018.06.007.
- San Millan, A., Heilbron, K. and MacLean, R. C. (2014) 'Positive epistasis between co-infecting plasmids promotes plasmid survival in bacterial populations', *ISME Journal*. Nature Publishing Group, 8(3), pp. 601–612. doi: 10.1038/ismej.2013.182.
- San Millan, A. and MacLean, R. C. (2017) 'Fitness Costs of Plasmids: a Limit to Plasmid Transmission', *Microbiology Spectrum*, 5(5), pp. 1–12. doi: 10.1128/microbiolspec.mtbp-0016-2017.
- San Millan, A. S. *et al.* (2016) 'Multicopy plasmids potentiate the evolution of antibiotic resistance in bacteria', *Nature Ecology and Evolution*. Nature Publishing Group, 1(1), pp. 1–8. doi: 10.1038/s41559-016-0010.
- Schafer, A., Kalinowski, J. and Puhler, A. (1994) 'Increased fertility of *Corynebacterium glutamicum* recipients in intergeneric matings with *Escherichia coli* after stress exposure', *Applied and Environmental Microbiology*, 60(2), pp. 756–759.
- Schmidt-Eisenlohr, H., Domke, N. and Baron, C. (1999) 'TraC of IncN plasmid pKM101 associates with membranes and extracellular high-molecular-weight structures in *Escherichia coli*', *Journal of Bacteriology*, 181(18), pp. 5563–5571.
- Schuenemann, V. J. (2013) 'Genome-Wide Comparison', *Science*, 341(July), pp. 179–183. doi: 10.1126/science.1238286.
- Sengeløv, G., Kovvalchuk, G. A. and Sørensen, S. J. (2000) 'Influence of fungal-bacterial

- interactions on bacterial conjugation in the residuesphere', *FEMS Microbiology Ecology*, 31(1), pp. 39–45. doi: 10.1016/S0168-6496(99)00079-3.
- Seoane, J. *et al.* (2011) 'An individual-based approach to explain plasmid invasion in bacterial populations', *FEMS Microbiology Ecology*, 75(1), pp. 17–27. doi: 10.1111/j.1574-6941.2010.00994.x.
- Shintani, M., Sanchez, Z. K. and Kimbara, K. (2015) 'Genomics of microbial plasmids: Classification and identification based on replication and transfer systems and host taxonomy', *Frontiers in Microbiology*, 6(MAR), pp. 1–16. doi: 10.3389/fmicb.2015.00242.
- Sia, E. A. *et al.* (1995) 'Different relative importances of the par operons and the effect of conjugal transfer on the maintenance of intact promiscuous plasmid RK2', *Journal of Bacteriology*, 177(10), pp. 2789–2797. doi: 10.1128/jb.177.10.2789-2797.1995.
- Simonsen, L. *et al.* (1990) 'Estimating the rate of plasmid transfer: an end-point method', *Journal of General Microbiology*, 136(11), pp. 2319–2325. doi: 10.1099/00221287-136-11-2319.
- Simonsen, L. (1991) 'The existence conditions for bacterial plasmids: Theory and reality', *Microbial Ecology*, 22(1), pp. 187–205. doi: 10.1007/BF02540223.
- Smillie, C. *et al.* (2010) 'Mobility of Plasmids', *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 74(3), pp. 434–452. doi: 10.1128/mmbr.00020-10.
- del Solar, G. *et al.* (1998) 'Replication and control of circular bacterial plasmids.', *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*, 62(2), pp. 434–64. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9618448>0Ahttp://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC98921.
- Sørensen, S. J. *et al.* (2005) 'Studying plasmid horizontal transfer in situ: A critical review', *Nature Reviews Microbiology*, 3(9), pp. 700–710. doi: 10.1038/nrmicro1232.
- Sørensen, S. J. and Jensen, L. E. (1998) 'Transfer of plasmid RP4 in the spermosphere and rhizosphere of barley seedling', *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 73(1), pp. 69–77. doi: 10.1023/A:1000661115753.
- Sota, M. *et al.* (2010) 'Shifts in the host range of a promiscuous plasmid through parallel evolution of its replication initiation protein', *The ISME Journal*, 4(12), pp. 1568–1580. doi: 10.1038/ismej.2010.72.
- St-Pierre, F. *et al.* (2013) 'One-step cloning and chromosomal integration of DNA', *ACS Synthetic Biology*, 2(9), pp. 537–541. doi: 10.1021/sb400021j.
- Staal, J. *et al.* (2019) 'Engineering a minimal cloning vector from a pUC18 plasmid backbone with an extended multiple cloning site', *BioTechniques*, 66(6), pp. 254–259. doi: 10.2144/btn-2019-0014.
- Stalder, T. and Top, E. (2016a) 'Plasmid transfer in biofilms: a perspective on limitations and opportunities', *Npj Biofilms And Microbiomes*. The Author(s), 2, p. 16022. Available at: <https://doi.org/10.1038/npjbiofilms.2016.22>.
- Stalder, T. and Top, E. (2016b) 'Plasmid transfer in biofilms: A perspective on limitations and opportunities', *npj Biofilms and Microbiomes*, 2(12), pp. 1625–1627. doi: 10.1038/npjbiofilms.2016.22.
- Stewart, F. M. and Levin, B. R. (1977) 'The population biology of bacterial plasmids: a priori

- conditions for the existence of conjugationally transmitted factors', *Genetics*, 87(2), pp. 209–228.
- Summers, D. (1998) 'Timing, self-control and a sense of direction are the secrets of multicopy plasmid stability', *Molecular Microbiology*, 29(5), pp. 1137–1145. doi: 10.1046/j.1365-2958.1998.01012.x.
- Summers, D. K. (1991) 'The kinetics of plasmid loss', *Trends in Biotechnology*, 9(1), pp. 273–278. doi: 10.1016/0167-7799(91)90089-Z.
- Summers, D. K. and Sherratt, D. J. (1984) 'Multimerization of high copy number plasmids causes instability: Cole 1 encodes a determinant essential for plasmid monomerization and stability', *Cell*, 36(4), pp. 1097–1103. doi: 10.1016/0092-8674(84)90060-6.
- Suzuki, H. *et al.* (2010) 'Predicting plasmid promiscuity based on genomic signature', *Journal of Bacteriology*, 192(22), pp. 6045–6055. doi: 10.1128/JB.00277-10.
- Suzuki, H., Brown, C. and Top, E. (2018) 'Genomic Signature Analysis to Predict Plasmid Host Range', in, pp. 458–464. doi: 10.1007/978-1-4614-1531-2_574.
- Svara, F. and Rankin, D. J. (2011) 'The evolution of plasmid-carried antibiotic resistance.', *BMC evolutionary biology*, 11, p. 130. doi: 10.1186/1471-2148-11-130.
- Tato, I. *et al.* (2005) 'TrwB, the coupling protein involved in DNA transport during bacterial conjugation, is a DNA-dependent ATPase', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(23), pp. 8156–8161. doi: 10.1073/pnas.0503402102.
- Tato, I. *et al.* (2007) 'The ATPase activity of the DNA transporter TrwB is modulated by protein TrwA: Implications for a common assembly mechanism of DNA translocating motors', *Journal of Biological Chemistry*, 282(35), pp. 25569–25576. doi: 10.1074/jbc.M703464200.
- Tatum, E. L. and Lederberg, J. (1947) 'Gene Recombination in the Bacterium *Escherichia coli*', *Journal of bacteriology*, 53(6), pp. 673–684.
- Top, E. M. and Springael, D. (2003) 'The role of mobile genetic elements in bacterial adaptation to xenobiotic organic compounds', *Current Opinion in Biotechnology*, 14(3), pp. 262–269. doi: 10.1016/S0958-1669(03)00066-1.
- Turner, P. E., Cooper, V. S. and Lenski, R. E. (1998) 'Tradeoff Between Horizontal and Vertical Modes of Transmission in Bacterial Plasmids', *Evolution*, 52(2), p. 315. doi: 10.2307/2411070.
- Volchenkov, D., Volchenkova, L. and Blanchard, P. (2002) 'Epidemic spreading in a variety of scale free networks', *Physical Review E - Statistical Physics, Plasmas, Fluids, and Related Interdisciplinary Topics*, 66(4), p. 9. doi: 10.1103/PhysRevE.66.046137.
- Wallden, K., Rivera-Calzada, A. and Waksman, G. (2010) 'Type IV secretion systems: Versatility and diversity in function', *Cellular Microbiology*, 12(9), pp. 1203–1212. doi: 10.1111/j.1462-5822.2010.01499.x.
- Wan, Z. *et al.* (2011) 'Measuring the rate of conjugal plasmid transfer in a bacterial population using quantitative PCR', *Biophysical Journal*. Biophysical Society, 101(1), pp. 237–244. doi: 10.1016/j.bpj.2011.04.054.
- Wang, Y. (2017) 'Spatial distribution of high copy number plasmids in bacteria', *Plasmid*. Elsevier Inc., 91, pp. 2–8. doi: 10.1016/j.plasmid.2017.02.005.
- Wang, Y., Penkul, P. and Milstein, J. N. (2016) 'Quantitative Localization Microscopy Reveals a Novel Organization of a High-Copy Number Plasmid', *Biophysical Journal*. Biophysical Society,

111(3), pp. 467–479. doi: 10.1016/j.bpj.2016.06.033.

Ward, J. M. and Grinsted, J. (1982) 'Physical and genetic analysis of the Inc-W group plasmids R388, Sa, and R7K', *Plasmid*. doi: 10.1016/0147-619X(82)90005-1.

Watanabe, T. and Fukasawa, T. (1961) 'Episome-mediated transfer of drug resistance in Enterobacteriaceae. I. Transfer of resistance factors by conjugation.', *Journal of bacteriology*, 81, pp. 669–78. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13783344>.

Watanabe, T., Furuse, C. and Sakaizumi, S. (1968) 'Transduction of various R factors by phage P1 in Escherichia coli and by phage P22 in Salmonella typhimurium.', *Journal of Bacteriology*, 96(5), pp. 1791–1795.

Wein, T. *et al.* (2019) 'Emergence of plasmid stability under non-selective conditions maintains antibiotic resistance', *Nature Communications*. Springer US, 10(1), pp. 1–13. doi: 10.1038/s41467-019-10600-7.

Werisch, M., Berger, U. and Berendonk, T. U. (2017) 'Conjugative plasmids enable the maintenance of low cost non-transmissible plasmids', *Plasmid*. Elsevier, 91(April), pp. 96–104. doi: 10.1016/j.plasmid.2017.04.004.

Wiedenbeck, J. and Cohan, F. M. (2011) 'Origins of bacterial diversity through horizontal genetic transfer and adaptation to new ecological niches', *FEMS Microbiology Reviews*, 35(5), pp. 957–976. doi: 10.1111/j.1574-6976.2011.00292.x.

Willetts, N. and Wilkins, B. (1984) 'Processing of plasmid DNA during bacterial conjugation', *Microbiological Reviews*, 48(1), pp. 24–41.

Williams, J. J. and Hergenrother, P. J. (2008) 'Exposing plasmids as the Achilles' heel of drug-resistant bacteria', *Current Opinion in Chemical Biology*, 12(4), pp. 389–399. doi: 10.1016/j.cbpa.2008.06.015.

Wolf, Y. I. *et al.* (1999) 'Evolution of Aminoacyl-tRNA synthetases-analysis of unique domain architectures and phylogenetic trees reveals a complex history of horizontal gene transfer events', *Genome Research*, 9(8), pp. 689–710.

Yano, H. *et al.* (2016) 'Evolved plasmid-host interactions reduce plasmid interference cost', *Molecular Microbiology*, 101(5), pp. 743–756. doi: 10.1111/mmi.13407.

Yeo, H.-J. *et al.* (2003) 'Structural and functional characterization of the VirB5 protein from the type IV secretion system encoded by the conjugative plasmid pKM101', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(26), pp. 15947–15952. doi: 10.1073/pnas.2535211100.

Yuan, Q. *et al.* (2005) 'Identification of the VirB4-VirB8-VirB5-VirB2 pilus assembly sequence of type IV secretion systems', *Journal of Biological Chemistry*, 280(28), pp. 26349–26359. doi: 10.1074/jbc.M502347200.

Zeng, X., Ardeshtna, D. and Lin, J. (2015) 'Heat shock-enhanced conjugation efficiency in standard campylobacter jejuni strains', *Applied and Environmental Microbiology*, 81(13), pp. 4546–4552. doi: 10.1128/AEM.00346-15.

Zhang, P. Y. *et al.* (2013) 'Combined treatment with the antibiotics kanamycin and streptomycin promotes the conjugation of Escherichia coli', *FEMS Microbiology Letters*, 348(2), pp. 149–156. doi: 10.1111/1574-6968.12282.

Zhang, Y. *et al.* (2018) 'A study on the role that quorum sensing play in antibiotic-resistant plasmid conjugative transfer in Escherichia coli', *Ecotoxicology*. Springer US, 27(2), pp. 209–

216. doi: 10.1007/s10646-017-1886-0.

Zhong, X. *et al.* (2010) 'Accounting for mating pair formation in plasmid population dynamics', *Journal of Theoretical Biology*, 262(4), pp. 711–719. doi: 10.1016/j.jtbi.2009.10.013.

Zhong, X. *et al.* (2012) 'On the meaning and estimation of plasmid transfer rates for surface-associated and well-mixed bacterial populations', *Journal of Theoretical Biology*, 294(2), pp. 144–152. doi: 10.1016/j.jtbi.2011.10.034.

Zwanzig, M. *et al.* (2019) 'Mobile Compensatory Mutations Promote Plasmid Survival', *mSystems*, 4(1), pp. 1–11. doi: 10.1128/msystems.00186-18.